



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Puesta a punto de un nuevo método de análisis instrumental por GC-MS y desarrollo de nuevas metodologías basadas en técnicas espectrales para la estimación de la composición aromática varietal de la uva</b>
Autor/es
<b>Sandra Marín San Román</b>
Director/es
Teresa Garde Cerdán, María Paz Diago Santamaría y Juan Fernández Novales
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos



Puesta a punto de un nuevo método de análisis instrumental por GC-MS y desarrollo de nuevas metodologías basadas en técnicas espectrales para la estimación de la composición aromática varietal de la uva, tesis doctoral de Sandra Marín San Román, dirigida por Teresa Garde Cerdán, María Paz Diago Santamaría y Juan Fernández Novales (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



## TESIS DOCTORAL

2023

Programa de Doctorado en Enología, Viticultura, y Sostenibilidad

# PUESTA A PUNTO DE UN NUEVO MÉTODO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL POR GC-MS Y DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS BASADAS EN TÉCNICAS ESPECTRALES PARA LA ESTIMACIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA VARIETAL DE LA UVA

**Sandra Marín San Román**

**Directora:** Teresa Garde Cerdán

**Directora:** María Paz Diago Santamaría

**Director:** Juan Fernández Novales





TERESA GARDE CERDÁN, Doctora en Ciencias Químicas y Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, MARIA PAZ DIAGO SANTAMARÍA, Doctora en Ciencias Agrarias y Alimentarias y Profesora Titular de la Universidad de La Rioja e Investigadora del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, y JUAN FERNÁNDEZ NOVALES, Doctor en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias e Investigador de la Universidad de La Rioja y del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada **“Puesta a punto de un nuevo método de análisis instrumental por GC-MS y desarrollo de nuevas metodologías basadas en técnicas espectrales para la estimación de la composición aromática varietal de la uva”**, ha sido realizada por Sandra Marín San Román en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora en Enología, Viticultura y Sostenibilidad.

Lo que hacen constar en Logroño, a 10 de julio de 2023

GARDE  
CERDAN  
TERESA -  
52442702B

Firmado digitalmente por GARDE CERDAN TERESA - 52442702B  
Fecha: 2023.07.10 08:45:56 +02'00'

DIAGO  
SANTAMARIA  
A MARIA PAZ  
- 16584746K

Firmado digitalmente por DIAGO SANTAMARIA MARIA PAZ - 16584746K  
Fecha: 2023.07.10 09:49:35 +02'00'

FERNANDEZ  
NOVALES  
JUAN -  
28755159F

Firmado digitalmente por FERNANDEZ NOVALES JUAN - 28755159F  
Fecha: 2023.07.10 09:58:14 +02'00'

Fdo: Teresa Garde Cerdán

Fdo: María Paz Diago Santamaría

Fdo: Juan Fernández Novales



## RELACIÓN DE REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE LAS PUBLICACIONES A LAS QUE HA DADO LUGAR LA TESIS DOCTORAL

El primer trabajo que se publicó como punto de partida para la presente tesis doctoral fue la siguiente revisión bibliográfica:

**Revisión:** Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2020). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*, 137, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>. **Indicadores de calidad:** índice de impacto 2022 (JCR): 8,11 (la revista ocupa, en el área de food science & technology, la posición 10 de 142: Q1).

A continuación, se relacionan los trabajos, **ya publicados**, derivados de la tesis doctoral, que la acreditan para ser publicada por *compendio de publicaciones*, así como los indicadores de calidad de los mismos:

**Artículo 1.** Marín-San Román, S., Carot-Sierra, J. M., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2022). Optimization of stir bar sorptive extraction (SBSE) and multi-stir bar sorptive extraction (mSBSE) to improve must volatile compounds extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 172, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114182>. **Indicadores de calidad:** índice de impacto 2022 (JCR): 6,0 (la revista ocupa, en el área de food science & technology, la posición 24 de 142: Q1).

**Artículo 2.** Marín-San Román, S., Carot-Sierra, J. M., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2022). Optimization of thin film-microextraction (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds. *Analytica Chimica Acta*, 1226, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340254>. **Indicadores de calidad:** índice

de impacto 2022 (JCR): 6,2 (la revista ocupa, en el área de chemistry, analytical, la posición 8 de 86: Q1).

**Artículo 3.** Marín-San Román, S., Fernández-Novales, J., Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Diago, M. P., & Garde-Cerdán, T. (2023). Monitorization of varietal aroma composition dynamics during ripening in intact *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries by hyperspectral imaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 2616-2627. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07425>. **Indicadores de calidad:** índice de impacto 2022 (JCR): 6,1 (la revista ocupa, en el área de agriculture, multidisciplinary, la posición 6 de 58: Q1).

Por otro lado, se relaciona otro trabajo, **ya publicado**, y derivado de la presente tesis doctoral, pero que no entra dentro de la acreditación para ser publicada por *compendio de publicaciones*, puesto que fue aceptado días más tarde de solicitar el permiso para la presentación de la tesis en este formato:

**Artículo 4.** Marín-San Román, S., Fernández-Novales, J., Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Diago, M.P., & Garde-Cerdán, T. (2023). Application of near-infrared spectroscopy for the estimation of volatile compounds in Tempranillo Blanco grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1-13. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12706>. **Indicadores de calidad:** índice de impacto 2022 (JCR): 6,1 (la revista ocupa, en el área de agriculture, multidisciplinary, la posición 6 de 58: Q1).

Por último, se presentan los trabajos derivados de la presente tesis doctoral que se encuentran **en preparación para su envío**:

**Artículo 5.** Marín-San Román et al. (2023). Use of the hyperspectral imaging to estimate the volatile composition of Tempranillo grape berries during ripening. En preparación para su envío a: *Scientia Horticulturae*

**Artículo 6.** Marín-San Román et al. (2023). NIR spectroscopy for predicting the aroma potential of intact Tempranillo grape berries during ripening. En preparación para su envío a: *Food Chemistry*



# FINANCIACIÓN

La presente tesis doctoral ha sido realizada con la ayuda de las siguientes financiaciones:

- Gobierno de La Rioja. Consejería de Desarrollo Económico e Innovación. Ayuda Predoctoral para la Investigación en los Centros Tecnológicos, Centros de Investigación y Empresas de la Comunidad Autónoma de La Rioja.
- Ayudas para la realización de tesis doctorales de la Universidad de La Rioja (ATUR) financiadas por Santander Universidades (convocatorias 2020, 2021 y 2022).
- Ayuda para la investigación de temas riojanos del Instituto de Estudios Riojanos (IER) 2020.
- Proyecto del grupo Viticultura y Enología Aplicadas (VIENAP) del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV): Nanoelicitores: tecnología innovadora para mejorar la calidad de la uva y del vino en un escenario de cambio climático (E-NANO)





## AGRADECIMIENTOS

Estos cuatro años y medio han sido, posiblemente, unos de los más bonitos, y a la vez difíciles, de mi vida. Durante la realización de mi tesis doctoral he podido crecer como profesional, y sobre todo como persona, pero, como podéis imaginar, no todo ha sido de color de rosa. Me he tenido que enfrentar a numerosos problemas y situaciones, que, sin lugar a duda, no hubiera podido superar sin la ayuda de las personas que voy a mencionar a continuación.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutora y directores de tesis, **Belén, Mari Paz, Juan y Tere**. A **Belén**, gracias por ser tan rápida y estar pendiente del RAPI durante estos años, sé que es un rollo. A **Mari Paz**, gracias por ser siempre tan agradable, y estar tan dispuesta a ayudar, también por tu rapidez, solvencia y eficacia. A **Juan**, muchas gracias por tu paciencia y por el tiempo dedicado a enseñarme absolutamente todo lo que sé sobre técnicas espectrales, espero no haberte dado muchos dolores de cabeza. Me gustaría hacer una mención especial a **Tere**, son demasiadas cosas que agradecerte. Gracias por confiar en mi para realizar esta tesis doctoral. Gracias por guiarme durante estos cuatro años y medio. Gracias por habérmelo hecho tan fácil. Gracias por encontrar soluciones para todo, y por las horas dedicadas a buscarlas, incluso de coche jaja. Gracias por ser clara conmigo y decirme siempre tanto lo bueno como lo malo, es lo que más me ha ayudado a crecer. Gracias por hacer todo lo posible para que pudiera avanzar en la tesis, ambas sabemos lo difícil que ha sido. Gracias por buscar financiación hasta debajo de las piedras. Gracias por compartir una parte de tus conocimientos conmigo, eres el claro ejemplo de la capacidad reforzada con trabajo. Y, sobre todo, gracias por haberme hecho partícipe de todo ello. Ojalá todo el mundo tuviera la suerte de tener una directora de tesis como tú.

También quiero agradecer a todos los compañeros que me han acompañado durante estos años, tanto en el despacho, como en el laboratorio, los cuales han

hecho, sin ninguna duda, más amena mi estancia en el ICVV: **Gastón, Bianca, Martina, Freud, David, Andrea, Edu, Carmen, Harold, Leslie, Miguel, Thomas, Nektaria, Konstantina, Nicola, María, Sara, Cristian, Tania**, y en especial a **Diego Canalejo, Alberto, Esti y Rebe**, que son los que más tiempo me han aguantado, tanto en el ICVV, como fuera de él. También me gustaría agradecer a los que han llegado en esta última etapa de escritura, que a pesar de vernos muy poco, siempre me han recibido con una sonrisa: **Mikel, Diego Paladines y Ekhiñe**.

Por supuesto, quisiera agradecer a mis chicas del grupo VIENAP, **Pili, Eva, Miriam, Itzi y Tere**. A **Pili**, gracias por tu simpatía, por tu disponibilidad para ayudar, y por ser tan buena compañera. A **Eva**, a pesar de no haber podido compartir tanto tiempo, gracias por tu trabajo, profesionalidad y tus conocimientos, estoy segura de que llegarás donde te propongas. A **Miriam**, gracias por tu alegría, por las risas, por tus opiniones sinceras, y por las cervecitas (en mi caso calimocho) en La Jala, sitio que jamás hubiera descubierto sola jaja. A **Itzi**, qué decirte que no sepas, a pesar de haber coincidido en la universidad, no tuvimos la oportunidad de conocernos, y, sin duda, has sido un gran descubrimiento. Gracias por tu ayuda, por tu amabilidad y generosidad, por ser amiga y compañera, y por los audios infinitos (por parte de ambas jaja). Eres de esas personas vitamina que siempre te reciben con una sonrisa, y te deseo todo lo bueno del mundo. Y a **Tere**, si, de nuevo, ya que no solo has sido directora, también has sido compañera. Gracias por crear este grupo tan genial. Gracias por hacernos reír con tus carcajadas, capaces de distinguirse desde cualquier parte del centro, y gracias por las largas conversaciones, tanto de fútbol, como de cualquier cosa, que cuando nos dan cuerda jajaj.

Por otro lado, quisiera agradecer a mis Albaceteños, **Cristina, Esther, Candi, Amaya, Kortés, Natalia, Merce**, y especialmente a **Cris y Ro**, por toda la ayuda

prestada, y a **Rosario y Gonzalo**, por darme la oportunidad de realizar mi estancia en vuestro grupo de investigación, sin la que no hubiera podido terminar la tesis doctoral. Entre todos me habéis hecho sentir como en casa.

Me gustaría agradecer también a mis amigos de la carrera, mis Gordacos, **Alicia, Andrea, Esther, Javi (Quintana para los amigos), María, Mónica y Paula**. Sé que no empecé con vosotros, pero desde el primer día que coincidimos, me tratasteis como una más, hasta el punto de convertirlos en mis amigos. Gracias por contagiarme vuestras ganas de aprender y de estudiar, por ser un gran ejemplo, y por hacerme darme cuenta de quién, y cómo, quería ser. Sin lugar a dudas, sois, en gran medida, responsables de que haya llegado hasta aquí. A mis niñas, **Ana, Carla y Jessi**, y a mis amigos de Villamediana, **Marcos, Sergio, Iñaki, Asier, Rixi, Luci, Adri, Moni, Eli y Rayo**, por los grandes momentos vividos juntos, y los que quedan.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia, ¿qué hubiera sido de mí sin vosotros? A mis cuatro abuelos, que tengo la suerte de seguir teniendo, **Calixto, Aurora, Maribel y Rober**, gracias por sentirlos siempre tan orgullosos de mí, y gracias por toda una vida dedicada al trabajo, tengo claro que parte de vuestro esfuerzo, ha hecho posible todo esto. A mis **tíos y primos**. Y, especialmente, gracias a mis padres **Juan José y Marisol**, a mi hermana **Paula**, y a **Martina**. Gracias por confiar en mí siempre y por apoyarme en todas mis decisiones. Gracias por alegraros de mis logros como si fueran vuestros, y sufrir los fracasos conmigo. Y, sobre todo, gracias por aguantar mi carácter en los malos momentos, sé que en estos últimos años no ha sido fácil, pero todo esfuerzo tiene su recompensa, y aquí está.

**Papá, mamá, todo lo que he conseguido en mi vida, ha sido gracias a vosotros. GRACIAS.**

Finalmente, me gustaría agradecer al Gobierno de La Rioja, por la ayuda predoctoral que ha permitido mi contratación por parte del CSIC, la cual ha hecho posible la realización de este trabajo, y a la Universidad de La Rioja, por las ayudas para la realización de tesis doctorales (ATUR), y por ser mi casa durante los últimos 12 años.

*A mis padres y hermana*



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACIONES .....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS.....	11
RESUMEN.....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR VITIVINÍCOLA.....</b>	<b>21</b>
1.1.1. Términos tradicionales de vinos españoles .....	21
<b>1.2. D.O.Ca. RIOJA.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3. LA MADURACIÓN DE LA BAYA .....</b>	<b>28</b>
1.3.1. Tipos de maduración .....	30
1.3.2. Factores que afectan a la maduración de la uva .....	31
1.3.3. Seguimiento de la maduración de las bayas.....	32
1.3.4. Fecha de vendimia .....	34
<b>1.4. COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN UVA Y VINO .....</b>	<b>36</b>
1.4.1. Aromas primarios .....	38
1.4.1.1. <i>Metoxipirazinas</i> .....	38
1.4.1.2. <i>Terpenos</i> .....	40
1.4.1.3. <i>C<sub>13</sub> norisoprenoides</i> .....	41
1.4.1.4. <i>Compuestos C<sub>6</sub></i> .....	43
1.4.1.5. <i>Otros compuestos</i> .....	43
1.4.2. Evolución de los aromas primarios a lo largo de la maduración de la uva .	
.....	44
<b>1.5. TÉCNICAS TRADICIONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE</b>	
<b>COMPUESTOS VOLÁTILES EN UVA.....</b>	<b>46</b>
1.5.1. SBSE-GC-MS .....	48
1.5.1.1. <i><sup>m</sup>SBSE-GC-MS</i> .....	51
1.5.2. TF-SPME-GC-MS.....	52

<b>1.6. MÉTODO CLÁSICO PARA LA MEDIDA DE LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES EN MOSTO.....</b>	<b>54</b>
<b>1.7. MÉTODOS NO INVASIVOS.....</b>	<b>56</b>
1.7.1. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS).....	57
1.7.1.1. <i>Fundamentos teóricos de la NIRS</i> .....	59
1.7.1.2. <i>Instrumentación de la NIRS</i> .....	62
1.7.1.3. <i>Adquisición y detección de la NIRS</i> .....	64
1.7.2. Imagen hiperespectral (HSI).....	65
1.7.2.1. <i>Fundamentos teóricos de la HSI</i> .....	66
1.7.2.2. <i>Instrumentación de la HSI</i> .....	68
1.7.2.3. <i>Adquisición y detección de la HSI</i> .....	69
<b>1.8. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO .....</b>	<b>72</b>
1.8.1. Pretratamientos espectrales .....	73
1.8.2. Análisis de componentes principales (PCA, <i>Principal Component Analysis</i> ). .....	75
1.8.3. Modelos de regresión o calibración multivariante .....	76
1.8.3.1. <i>Evaluación de la capacidad predictiva del modelo de calibración</i> .....	79
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>85</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
<b>3.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL         ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO.....</b>	<b>91</b>
3.1.1. Materiales y equipos analíticos utilizados para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup> SBSE y la TF-SPME .....	91
3.1.1.1. <i>Materiales</i> .....	91
3.1.1.2. <i>Reactivos</i> .....	93
3.1.1.3. <i>Patrones</i> .....	93
3.1.1.4. <i>Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS)</i> .....	94
3.1.2. Características y localización del área de muestreo para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup> SBSE y la TF-SPME .....	95



3.1.3.	Toma de muestras para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup> SBSE y la TF-SPME	96
3.1.4.	Preparación de las muestras para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup> SBSE y la TF-SPME	97
3.1.5.	Disolución patrón para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup> SBSE y la TF-SPME	97
3.1.6.	Optimización del método de SBSE-GC-MS	98
3.1.6.1.	<i>Diseño de experimentos (DoE) para la SBSE</i>	98
3.1.6.2.	<i>Acondicionamiento y limpieza de los Twisters de PDMS</i>	99
3.1.6.3.	<i>Extracción de compuestos volátiles por SBSE</i>	101
3.1.6.4.	<i>Condiciones de desorción para la SBSE-GC-MS</i>	103
3.1.6.5.	<i>Condiciones cromatográficas para la SBSE-GC-MS</i>	104
3.1.7.	Optimización del método de <sup>m</sup> SBSE-GC-MS	107
3.1.7.1.	<i>Diseño de experimentos (DoE) para la <sup>m</sup>SBSE</i>	107
3.1.7.2.	<i>Acondicionamiento y limpieza de los Twisters de EG</i>	108
3.1.7.3.	<i>Extracción de compuestos volátiles por <sup>m</sup>SBSE</i>	110
3.1.7.4.	<i>Condiciones de desorción para la <sup>m</sup>SBSE-GC-MS</i>	111
3.1.7.5.	<i>Condiciones cromatográficas para la <sup>m</sup>SBSE-GC-MS</i>	112
3.1.8.	Optimización del método de TF-SPME-GC-MS	112
3.1.8.1.	<i>Diseño de experimentos (DoE) para la TF-SPME</i>	112
3.1.8.2.	<i>Acondicionamiento y limpieza de las TFs</i>	113
3.1.8.3.	<i>Extracción de compuestos volátiles por TF-SPME</i>	115
3.1.8.4.	<i>Condiciones de desorción para la TF-SPME-GC-MS</i>	116
3.1.8.5.	<i>Condiciones cromatográficas para la TF-SPME-GC-MS</i>	117
3.1.9.	Análisis estadístico	118
<b>3.2.</b>	<b>USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO</b>	<b>120</b>
3.2.1.	Materiales, sensores y equipo analítico	120
3.2.1.1.	<i>Materiales</i>	120
3.2.1.2.	<i>Cámara hiperespectral</i>	121

3.2.1.3. Espectrómetro de infrarrojo cercano (NIR).....	122
3.2.1.4. Refractómetro .....	122
3.2.1.5. Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) .....	123
3.2.2. Características y localización de las áreas de muestreo.....	124
3.2.2.1. Parcela de Tempranillo Blanco.....	124
3.2.2.2. Parcela de Tempranillo.....	125
3.2.3. Toma de las muestras para la adquisición de espectros y la medida de su composición aromática y de los TSS.....	126
3.2.3.1. Tempranillo Blanco .....	126
3.2.3.2. Tempranillo .....	129
3.2.4. Preparación de las muestras para la adquisición de espectros y la medida de su composición aromática y de los TSS .....	130
3.2.5. Medidas espectrales mediante HSI y NIRS .....	132
3.2.5.1. Adquisición de imágenes hiperespectrales en el rango VIS+SW-NIR .....	132
3.2.5.2. Adquisición de medidas espectrales mediante espectroscopía NIR .....	135
3.2.6. Análisis de compuestos volátiles en mostos de Tempranillo y Tempranillo Blanco mediante TF-SPME-GC-MS .....	137
3.2.6.1. Extracción de compuestos volátiles del mosto mediante TF-SPME .....	137
3.2.6.2. Condiciones de desorción para la TF-SPME-GC-MS .....	138
3.2.6.3. Condiciones cromatográficas para la TF-SPME-GC-MS.....	139
3.2.6.4. Curvas de calibrado.....	142
3.2.7. Medida de los sólidos solubles totales (TSS) mediante refractometría ..	143
3.2.8. Análisis estadístico .....	143
3.2.8.1. Pretratamientos espectrales.....	144
3.2.8.2. Reducción de la dimensionalidad mediante análisis de componentes principales (PCA) .....	147
3.2.8.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS).....	147
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>151</b>
4.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO.....	153

4.1.1.	Artículo 1: Optimización de los métodos de SBSE y <sup>m</sup> SBSE.....	153
4.1.2.	Artículo 2: Optimización del método de TF-SPME con las fases absorbentes de PDMS/CAR y PDMS/DVB.....	167
<b>4.2.</b>	<b>COMPARACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES OBTENIDAS CON LOS MÉTODOS DE SBSE y TF-SPME.....</b>	<b>181</b>
<b>4.3.</b>	<b>USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO .....</b>	<b>185</b>
4.3.1.	Artículo 3: Uso de la imagen hiperespectral (HSI) para la predicción de la composición aromática y los TSS en bayas de Tempranillo Blanco.....	185
4.3.2.	Artículo 4: Uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) para la predicción de la composición aromática y los TSS en bayas de Tempranillo Blanco.....	201
4.3.3.	Artículo 5: Uso de la imagen hiperespectral (HSI) para la predicción de la composición volátil y los TSS en bayas de Tempranillo.....	217
4.3.4.	Artículo 6: Uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) para la predicción de la composición aromática y los TSS en bayas de Tempranillo .....	259
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN GLOBAL.....</b>	<b>303</b>
<b>5.1.</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO.....</b>	<b>305</b>
5.1.1.	Optimización de los métodos de SBSE y <sup>m</sup> SBSE .....	305
5.1.2.	Optimización del método TF-SPME con las fases absorbentes de PDMS/CAR y PDMS/DVB .....	308
<b>5.2.</b>	<b>USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO .....</b>	<b>313</b>
5.2.1.	Evaluación del uso de HSI y NIRS para estimar la madurez aromática y tecnológica en bayas de Tempranillo Blanco.....	315

5.2.2. Evaluación del uso de HSI y NIRS para estimar la madurez aromática y tecnológica en bayas de Tempranillo .....	318
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>323</b>
6.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO.....	325
6.2. COMPARACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES OBTENIDAS CON LOS MÉTODOS DE SBSE y TF-SPME .....	325
6.3. USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO .....	326
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>329</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>357</b>
ANEXO I: Artículo de revisión sobre los avances en las técnicas analíticas para la extracción de compuestos volátiles de la uva y del vino .....	359
ANEXO II: Corrección de la Tabla 6 del Artículo 1.....	375

## LISTA DE ABREVIACIONES

$\mu\text{g/L}$  – microgramo/litro

$\mu\text{L}$  – microlitro

$\mu\text{m}$  – micrómetro

$^{\circ}\text{Brix}$  – grado Brix

$^{\circ}\text{C}$  – grado centígrado

$^{\circ}\text{C/min}$  – grados centígrados/minuto

1D – una dimensión

2D – dos dimensiones

3D – tres dimensiones

A – absorbancia

ANOVA – análisis de la varianza

B – bloque

$c$  – concentración de moléculas absorbentes

CAR – carboxeno

CCD – dispositivo de carga acoplada

CCD2 – dispositivo de enfriamiento criostático

CIS-4 – sistema de inyección refrigerado

CMOS – semiconductor complementario de óxido metálico

CV – validación cruzada

$D$  – intensidad de la luz procedente de la referencia oscura

D.O. – Denominación de Origen

D.O.Ca. – Denominación de Origen Calificada

D.O.P. – Denominación de Origen Protegida

DI – inmersión directa

DMAPP – dimetilalil pirofosfato

DoE – diseño de experimentos

DT – ajuste de la línea base o *De-Trending*

## ABREVIACIONES

---

**DVB** – divinilbenceno

**EG** – etilenglicol

**EIC** – cromatograma de iones extraídos

**ESYRCE** – Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos

**EtOH** – etanol

**eV** – electronvoltio

**F** – foro

**FIR** – infrarrojo lejano

**fps** – fotogramas por segundo

**FT** – transformada de Fourier

**g** – gramo

**G** – intensidad de la luz reflejada

**g/L** – gramo/litro

**GC** – cromatografía de gases o cromatógrafo de gases

**GC-MS** – cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas

**GGPP** – geranilgeranil pirofosfato

**GPP** – geranil pirofosfato

**h** – hora

**H<sub>2</sub>O** – agua

**ha** – hectárea

**HgCdTe** – telurio de mercurio y cadmio

**hL** – hectolitro

**HLB** – balance hidrofílico-lipofílico

**HS** – espacio de cabeza

**HSI** – imagen hiperespectral

**I.G.P.** – Indicación Geográfica Protegida

***I<sub>0</sub>*** – intensidad de la radiación sobre la muestra

**IBMP** – 3-isobutil-2-metoxipirazina

**InAs** – arseniuro de indio

**InGaAs** – arseniuro de galio e indio

**IPMP** – 3-isopropil-2-metoxipirazina

**IPP** – isopentenil pirofosfato

**IR** – infrarrojo

$I_t$  – intensidad de la energía transmitida

$K$  – coeficiente de absorción molecular

**Kg** – kilogramo

$l$  – paso óptico de la luz a través de la muestra

**L/m<sup>2</sup>** – litro/metro cuadrado

**LLE** – extracción líquido-líquido

**LV** – variables latentes

**m** – metro

**m.s.n.m.** – metros sobre el nivel del mar

$m/z$  – masa/carga

**MAPA** – Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

**MEP** – metileritritol fosfato

**mg/L** – miligramo/litro

**mg/mL** – miligramo/mililitro

**min** – minuto

**MIR** – infrarrojo medio

**mL** – mililitro

**mL/min** – mililitros/minuto

**MLR** – regresión lineal múltiple

**mm** – milímetro

**MPLS** – mínimos cuadrados parciales modificados

**MPS** – muestreador multipropósito

**MS** – espectrometría de masas o espectrómetro de masas

## ABREVIACIONES

---

**ms** – milisegundo

**mSBSE** – extracción mediante múltiples barritas agitadoras absorbentes

**MVA** – ácido mevalónico

**NaCl** – cloruro de sodio

**ng/L** – nanogramo/litro

**NIR** – infrarrojo cercano

**NIRS** – espectroscopía de infrarrojo cercano

**NIST** – Instituto Nacional de Normas y Tecnología

**nm** -nanómetro

**OIV** – Organización Internacional de la Viña y el Vino

**P.I.** – patrón interno

**PbS** – sulfuro de plomo (II)

**PC** – componente principal

**PCA** – análisis de componentes principales

**PCR** – regresión en componentes principales

**PDMS** – polidimetilsiloxano

**PDMS/CAR** – polidimetilsiloxano/carboxeno

**PDMS/DVB** – polidimetilsiloxano/divinilbenceno

**PLS** – mínimos cuadrados parciales

**psi** – libra de fuerza por pulgada cuadrada

**Q** – simple cuadrupolo

**QqQ** – triple cuadrupolo

**R** – reflectancia

**R<sup>2</sup>** – coeficiente de determinación

**R<sup>2</sup><sub>c</sub>** – coeficiente de determinación de la calibración

**R<sup>2</sup><sub>cv</sub>** – coeficiente de determinación de la validación cruzada

**R<sup>2</sup><sub>p</sub>** – coeficiente de determinación de predicción externa

**RDGIA** – Resolución de la Dirección General de la Industria Alimentaria



**ROI** – región o regiones de interés

**RPD** – desviación predictiva residual

**rpm** – revoluciones por minuto

**s** – segundo

**SBMP** – 3-sec-butil-2-metoxipirazina

**SBSE** – extracción mediante barrita agitadora absorbente

**SD** – desviación estándar

**SE** – error típico

**SEC** – error típico de calibración

**SECV** – error típico de validación cruzada

**SEP** – error típico de predicción

**Si** – Silicio

**SNV** – variable normal estándar

**SPE** – extracción en fase sólida

**SPME** – microextracción en fase sólida

**SW-NIR** – infrarrojo cercano de onda corta

**T** – transmitancia

**T<sup>a</sup>** - temperatura

**TDN** – 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno

**TDU** – unidad de desorción térmica

**TF** – lámina de malla de carbono o película fina

**TF-SPME** – microextracción en fase sólida mediante película fina

**TPS** – terpeno sintasa

**TSS** – sólidos solubles totales

**Twister** – barrita agitadora

**VIS** – visible

**VIS+SW-NIR** – visible + infrarrojo cercano de onda corta

**W** – intensidad de la luz procedente de la referencia del blanco

## *ABREVIACIONES*

---

**W** – watos

$\lambda$  – longitud de onda

$\nu$  – frecuencia

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Mapa de las tres zonas de la D.O.Ca. Rioja: Rioja Alta, Rioja Alavesa y Rioja Oriental .....	25
<b>Figura 1.2.</b> Racimo de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo Blanco .....	26
<b>Figura 1.3.</b> Racimo de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo .....	27
<b>Figura 1.4.</b> Racimo de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo durante el envero .....	28
<b>Figura 1.5.</b> Evolución de algunos de los constituyentes de la baya durante su maduración. ....	29
<b>Figura 1.6.</b> Vías de síntesis de los principales aromas varietales .....	39
<b>Figura 1.7.</b> Estructura de las principales metoxipirazinas encontradas en la uva .....	39
<b>Figura 1.8.</b> Estructura de los principales alcoholes monoterpénicos o terpenoles encontrados en la uva .....	40
<b>Figura 1.9.</b> Estructura de los C <sub>13</sub> norisoprenoides más abundantes en la uva.....	42
<b>Figura 1.10.</b> Estructura de los principales compuestos C <sub>6</sub> encontrados en la uva .....	43
<b>Figura 1.11.</b> Partes de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) acoplado a un sistema automuestreador multipropósito (MPS).....	49
<b>Figura 1.12.</b> Procedimiento de la <sup>m</sup> SBSE propuesto por Ochiai (2018) .....	51
<b>Figura 1.13.</b> A) Refractómetro portátil para la medida de los sólidos solubles totales directamente en el viñedo. B) Medida de la densidad de un mosto en la bodega.....	55
<b>Figura 1.14.</b> Espectro electromagnético.....	59
<b>Figura 1.15.</b> Distribución de sobretonos y combinación de sobretonos de los principales enlaces orgánicos en la región NIR.....	61
<b>Figura 1.16.</b> Partes de un espectrómetro NIR.....	64
<b>Figura 1.17.</b> Formas de detección de análisis NIR para muestras agroalimentarias .....	65
<b>Figura 1.18.</b> Esquema de la imagen hiperespectral (HSI).....	67
<b>Figura 1.19.</b> Modos de adquisición en imagen hiperespectral (HSI) .....	70
<b>Figura 1.20.</b> Modos de detección en imagen hiperespectral (HSI).....	71
<b>Figura 1.21.</b> Esquema de validación cruzada k-fold de un conjunto de muestras divididas en 4 bloques (k = 4).....	78

<b>Figura 1.22.</b> Esquema de la evaluación de la capacidad predictiva de la ecuación de regresión o modelo de calibración calculado .....	79
<b>Figura 3.1.</b> Incubadora con los agitadores de seis posiciones.....	91
<b>Figura 3.2.</b> <i>Twisters</i> de A) polidimetisiloxano (PDMS) y de B) etilenglicol (EG) .....	92
<b>Figura 3.3.</b> Lámina de malla de carbono o película fina (TF), vial roscado e inserto de metal TF .....	93
<b>Figura 3.4.</b> Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS).....	94
<b>Figura 3.5.</b> Parcela de Tempranillo ( <i>Vitis vinifera</i> L.) situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).....	95
<b>Figura 3.6.</b> Cepas marcadas de la parcela de Tempranillo situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).....	96
<b>Figura 3.7.</b> Proceso de preparación de la muestra para la optimización de los métodos analíticos SBSE, <sup>m</sup> SBSE y TF-SPME.....	97
<b>Figura 3.8.</b> Viales de 20 mL para HS-SBSE con un <i>Twister</i> de PDMS dentro del inserto de vidrio para espacio de cabeza.....	101
<b>Figura 3.9.</b> Viales de 20 mL con A) el <i>Twister</i> de PDMS por inmersión y B) un <i>Twister</i> de PDMS por inmersión y otro por espacio de cabeza.....	102
<b>Figura 3.10.</b> Vial de 20 mL con un <i>Twister</i> de PDMS por inmersión y otro de EG por espacio de cabeza .....	110
<b>Figura 3.11.</b> Esquema del proceso de extracción de compuestos volátiles mediante TF-SPME .....	116
<b>Figura 3.12.</b> Cámara de imagen hiperespectral Resonon Pika L VIS-NIR .....	121
<b>Figura 3.13.</b> Partes de la cámara de imagen hiperespectral .....	121
<b>Figura 3.14.</b> Espectrómetro NIR PSS 2120 .....	122
<b>Figura 3.15.</b> Refractómetro digital DBR-95.....	123
<b>Figura 3.16.</b> Cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5975C) .....	123
<b>Figura 3.17.</b> Situación de las parcelas donde se tomaron las muestras de Tempranillo Blanco y Tempranillo dentro de la D.O.Ca. Rioja.....	124
<b>Figura 3.18.</b> Parcela de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo Blanco situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).....	125

<b>Figura 3.19.</b> Parcela de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo situada en Tudelilla (La Rioja, España).....	126
<b>Figura 3.20.</b> Esquema de la parcela de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo Blanco en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España) .....	128
<b>Figura 3.21.</b> Esquema de la parcela de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo (Tudelilla, La Rioja, España).....	130
<b>Figura 3.22.</b> Esquema de la preparación de las muestras de una fecha de Tempranillo .....	131
<b>Figura 3.23.</b> Proceso de adquisición de imágenes hiperespectrales.....	134
<b>Figura 3.24.</b> Submuestra de 8 bayas de una de las muestras de Tempranillo Blanco preparada para ser medida en el espectrómetro NIR.....	135
<b>Figura 3.25.</b> Esquema del triturado de muestras posterior a la adquisición de medidas espectrales .....	136
<b>Figura 3.26.</b> Esquema del proceso de preparación de la muestra para la extracción de compuestos volátiles mediante TF-SPME en muestras de mosto de Tempranillo Blanco .....	138
<b>Figura 3.27.</b> Diagrama de flujo del análisis de datos de imágenes hiperespectrales y espectroscopía NIR para la construcción de los modelos de calibración.....	143
<b>Figura 3.28.</b> A) Imagen hiperespectral (VIS+SW-NIR) de 32 bayas colocadas en los dos porta muestras con las regiones de interés (ROI) seleccionadas. B) Espectros de absorbancia media de cada baya de una submuestra de Tempranillo Blanco y C) de una submuestra de Tempranillo. D) Espectro promedio de absorbancia de todas las bayas en una submuestra de Tempranillo Blanco, y E) de una submuestra de Tempranillo .....	145
<b>Figura 3.29.</b> Espectros promedios de cada una de las 20 muestras de una fecha de A) Tempranillo Blanco, y B) Tempranillo, para la región NIR.....	146



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1.</b> Factores y condiciones a optimizar para la técnica de SBSE.....	99
<b>Tabla 3.2.</b> Condiciones cromatográficas del método de acondicionamiento y limpieza para los <i>Twisters</i> de PDMS .....	100
<b>Tabla 3.3.</b> Condiciones de desorción del método cromatográfico utilizado para la SBSE .....	103
<b>Tabla 3.4.</b> Lista de compuestos volátiles identificados en los cromatogramas obtenidos con el método SBSE-GC-MS y valores de <i>m/z</i> utilizados para su integración.....	105
<b>Tabla 3.5.</b> Condiciones cromatográficas del método analítico utilizado para el análisis e identificación de compuestos volátiles en mosto extraídos por SBSE, <sup>m</sup> SBSE y TF-SPME .....	106
<b>Tabla 3.6.</b> Factores y condiciones a optimizar para la técnica de <sup>m</sup> SBSE.....	107
<b>Tabla 3.7.</b> Condiciones cromatográficas del método de acondicionamiento y limpieza para los <i>Twisters</i> de EG .....	109
<b>Tabla 3.8.</b> Condiciones de desorción del método cromatográfico para la <sup>m</sup> SBSE .....	111
<b>Tabla 3.9.</b> Factores y condiciones a optimizar para la técnica de TF-SPME, para cada tipo de fase (PDMS/CAR y PDMS/DVB) .....	113
<b>Tabla 3.10.</b> Condiciones cromatográficas del método de acondicionamiento para las TFs de PDMS/CAR y las de PDMS/DVB.....	114
<b>Tabla 3.11.</b> Condiciones de desorción del método cromatográfico para la TF-SPME .....	117
<b>Tabla 3.12.</b> Fechas de recogida de las muestras en las campañas de 2019 y 2020 para la variedad <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo Blanco.....	127
<b>Tabla 3.13.</b> Fechas de recogida de las muestras en las campañas de 2019 y 2020 para la variedad <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo.....	129
<b>Tabla 3.14.</b> Número de muestras por fecha, año y totales para cada una de las variedades (Tempranillo Blanco y Tempranillo) .....	131
<b>Tabla 3.15.</b> Lista de compuestos volátiles identificados en las muestras de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo Blanco y Tempranillo mediante TF-SPME y valores de <i>m/z</i> utilizados para su integración.....	140

<b>Tabla 3.16.</b> Condiciones cromatográficas del método de TF-SPME-GC-MS utilizadas para determinar los compuestos volátiles de las muestras de <i>Vitis vinifera</i> L. Tempranillo Blanco y Tempranillo.....	141
<b>Tabla 3.17.</b> Patrones comerciales con los que se realizaron las curvas de calibración, y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ) .....	142
<b>Tabla 3.18.</b> Conjuntos de datos para las dos variedades (Tempranillo Blanco y Tempranillo) y los dos rangos espectrales (VIS+SW-NIR y NIR).....	147
<b>Tabla 3.19.</b> Número de muestras totales para cada conjunto de datos original y para cada conjunto de datos independiente .....	148
<b>Tabla 4.1.</b> Valores del área relativa con respecto al 2-octanol (P.I.) obtenidos con la mejor combinación de condiciones de los métodos de SBSE y TF-SPME para cada uno de los compuestos volátiles identificados en los mostos .....	182
<b>Tabla 8.1.</b> Corrección de la Tabla 6 del Artículo 1. Valores del área relativa con respecto al 2-octanol (P.I.) obtenidos con las condiciones globales de los dos métodos (SBSE y <sup>m</sup> SBSE) para cada uno de los compuestos.....	375



# RESUMEN





La composición volátil de la uva es uno de los parámetros más importantes para determinar la calidad del mosto y del vino. Los aromas de la uva, también llamados primarios, se dividen en aromas varietales y prefermentativos. Estos compuestos se encuentran en muy bajas concentraciones en la uva, por lo que, para llevar a cabo su identificación y cuantificación, se requiere de un método eficaz de extracción para su posterior análisis cromatográfico. El análisis de compuestos volátiles de las uvas mediante métodos cromatográficos presenta numerosos inconvenientes, como el consumo de tiempo, la pérdida de muestra y preparación de la misma, los costes de reactivos e instrumentación y la necesidad de personal formado, por lo que estos equipos solo están disponibles en algunos centros de investigación y en grandes bodegas. Actualmente no existe ningún método que permita realizar análisis rutinarios a tiempo real de la composición aromática de las uvas a lo largo de su maduración, hecho que le permitiría al viticultor tomar decisiones respecto a las prácticas vitícolas, a la elección de la fecha de vendimia o a la clasificación de la uva en función de su calidad aromática. Este hecho ha cobrado mayor importancia en los últimos años debido al desequilibrio entre la madurez industrial (contenido de azúcares/ácidos) y las madureces fenólica y aromática en la uva, provocado por el efecto del cambio climático. Como consecuencia del mismo, las bayas alcanzan más rápidamente el contenido adecuado de azúcares (medidos como sólidos solubles totales (TSS, *Total Soluble Solids*) (°Brix)), pero no de compuestos fenólicos y aromáticos (compuestos que se sintetizan más tarde en la baya).

En los últimos años se han desarrollado métodos rápidos y no destructivos que permiten relacionar datos espectrales con la concentración de componentes químicos específicos (TSS, compuestos fenólicos, compuestos aromáticos, compuestos nitrogenados...). Dos de estas tecnologías son la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS, *Near-Infrared Spectroscopy*) y la imagen hiperespectral (HSI, *Hyperspectral Imaging*). Ambas han sido utilizadas para estimar tanto

parámetros generales en las uvas, como aminoácidos, o compuestos fenólicos. La NIRS se ha utilizado para medir la composición aromática en vinos, pero se ha utilizado muy poco para estimar la composición volátil de las bayas. En cuanto a la HSI, se ha utilizado para medir la composición aromática de otras matrices alimentarias como café, huevos o carne de cerdo, pero, únicamente se ha encontrado un trabajo en el que haya sido utilizada para estimar la composición aromática de la uva y ninguno para monitorizar la misma a lo largo de su maduración.

Por todos estos motivos, en la presente tesis doctoral se han desarrollado nuevas metodologías, basadas en técnicas espectrales, que permiten la estimación y monitorización de la composición aromática de la uva a lo largo de la maduración, de forma rápida y no invasiva.

Para ello, en primer lugar, se optimizaron tres técnicas para la extracción de compuestos volátiles en mosto: extracción mediante barrita agitadora absorbente (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*), su variante multi-SBSE (<sup>m</sup>SBSE), en la que se utilizaron barritas agitadoras de polidimetilsiloxano (PDMS) y de etilenglicol (EG) de forma simultánea, y microextracción en fase sólida mediante película fina (TF-SPME, *Thin Film – Solid Phase Microextraction*), en la que se probaron las películas finas de PDMS/carboxen (PDMS/CAR) y de PDMS/divinilbenceno (PDMS/DVB). Los factores optimizados fueron el modo, velocidad, tiempo y temperatura de extracción, y la adición de NaCl. A su vez, se puso a punto el análisis de dichos compuestos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS, *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*). Una vez optimizadas las tres técnicas, se eligió la que mejores resultados proporcionó, que fue TF-SPME-GC-MS, con la película fina de PDMS/CAR y bajo las condiciones de inmersión directa (DI), a 500 rpm, durante 6 horas a 20 °C. Dicha técnica se utilizó

posteriormente como método de referencia para la determinación de compuestos volátiles en las muestras de mosto.

En segundo lugar, se tomaron medidas espectrales, en condiciones de laboratorio, de 240 muestras de *Vitis vinifera* L. Tempranillo y 240 de Tempranillo Blanco, recogidas durante los años 2019 y 2020, mediante HSI en el rango 400-1.000 nm y mediante NIRS en el rango 1.100 – 2.100 nm.

En tercer lugar, se midieron los TSS mediante refractometría y se analizaron los compuestos volátiles de esas mismas muestras con el método TF-SPME-GC-MS optimizado, se integraron los cromatogramas y se obtuvieron, de esta forma, los datos de referencia. Por último, se construyeron los modelos de calibración multivariante, mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS), utilizando los datos espectrales adquiridos y los datos de referencia.

Los resultados obtenidos demostraron que las técnicas HSI y NIRS permiten diferenciar entre valores altos, medios y bajos de cada compuesto volátil, e incluso cuantificar la concentración de muchos de ellos, así como de los TSS, en la variedad Tempranillo Blanco a lo largo de su maduración. Por otro lado, los resultados obtenidos para la variedad Tempranillo demostraron que las técnicas espectrales HSI y NIRS permiten diferenciar entre valores altos y bajos de concentración de compuestos volátiles y, en ocasiones, diferenciar entre valores altos, medios y bajos de concentración de los mismos. También permiten cuantificar los TSS.

En esta tesis doctoral se ha desarrollado, por primera vez, una herramienta que permite predecir la madurez tecnológica y la madurez aromática, simultáneamente, de forma rápida, sin contacto y no invasiva, a lo largo de la maduración de las bayas de Tempranillo Blanco y Tempranillo.





# 1.

## INTRODUCCIÓN







## 1.1. SITUACIÓN ACTUAL DEL SECTOR VITIVINÍCOLA

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), una organización intergubernamental, formada por más de 49 estados miembros, calculó, para el año 2021, 7.327.174 ha de superficie de viñedo mundial, de las cuales 962.531 ha pertenecen a España, convirtiéndolo así en el país con mayor superficie de viñedo del mundo, seguido por Francia, con 797.600 ha, por China, con 782.600 ha y por Italia, con 718.457 ha.

En cuanto a la producción mundial de vino, en 2021, la OIV calculó 262 millones de hL, siendo España el tercer país productor, con 35 millones de hL, el octavo país consumidor, con 10,35 millones de hL, y el país que más vino exportó, con 23,6 millones de hL (Fuente OIV: actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2021).

Las 17 comunidades autónomas de España poseen superficie de viñedo, situándose aproximadamente el 48 % en Castilla-La Mancha, seguido de Extremadura con un 9 % y de Castilla y León con un 7,5 %. En la comunidad autónoma de La Rioja se encuentra el 5,5 % de superficie de viñedo español, siendo la sexta comunidad autónoma con mayor superficie (Fuente MAPA: Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE)).

### 1.1.1. Términos tradicionales de vinos españoles

En España existen unos regímenes de calidad que se establecen para ayudar a los productores y consumidores a identificar productos vinculados a una zona geográfica. Estos términos son Denominación de Origen Protegida (D.O.P.) e Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) (Fuente MAPA: términos tradicionales de vinos).

## 1. INTRODUCCIÓN

---

- Denominación de Origen Protegida (D.O.P.): identifica al producto como originario de un lugar determinado, una región o, excepcionalmente, un país, cuya calidad o características se deben fundamental o exclusivamente a un medio geográfico en particular, con los factores naturales y humanos inherentes a él, y cuyas fases de producción tengan lugar en su totalidad en la zona geográfica definida. Dentro de la D.O.P. se pueden encontrar los siguientes términos:
  - *Denominación de Origen (D.O.):* nombre de una región, comarca, localidad, o lugar delimitado que haya sido reconocido administrativamente para designar vinos que hayan sido elaborados en una región, comarca, localidad o lugares determinados con uvas procedentes de los mismos, que disfruten de un elevado prestigio en el tráfico comercial en atención a su origen, y cuya calidad y características se deban fundamental o exclusivamente al medio geográfico que incluye los factores naturales y humanos.
  - *Denominación de Origen Calificada (D.O.Ca.):* además de los requisitos exigidos para la D.O., para la D.O.Ca. deben haber transcurrido, al menos, 10 años desde su reconocimiento como D.O., los productos amparados se deben comercializar exclusivamente embotellados desde bodegas inscritas y ubicadas en la zona geográfica delimitada, y dentro de su zona de producción, deben estar delimitados cartográficamente, por cada término municipal, los terrenos que se consideren aptos para producir vinos con derecho a la D.O.Ca.
  - *Vino de Pago:* designa el paraje o sitio rural con características edáficas y de microclima propias que lo diferencian y distinguen de otros de su entorno, conocido con un nombre vinculado de forma tradicional y notoria al cultivo de los viñedos de los que se obtienen vinos con rasgos

y cualidades singulares y cuya extensión máxima será limitada reglamentariamente por la administración competente, de acuerdo con las características propias de cada comunidad autónoma.

- *Vino de Calidad*: vino producido en una región, comarca, localidad o lugar determinado, con uvas procedentes de los mismos, cuya calidad, reputación o características se deban al medio geográfico, al factor humano o a ambos, en lo que se refiere a la producción de la uva, a la elaboración del vino o a su envejecimiento.
- Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.): un nombre que identifica un producto originario de un lugar determinado, una región o un país, que posea una cualidad determinada, una reputación u otra característica que pueda esencialmente atribuirse a su origen geográfico, y de cuyas fases de producción, al menos una, tenga lugar en la zona geográfica definida.
  - *Vino de la Tierra*: para poder llamar a un vino, vino de la tierra, se deben conocer la categoría o categorías de vino a los que es aplicable la mención, el nombre de la indicación geográfica a emplear, la delimitación precisa del área geográfica, las variedades de vid aptas y la graduación alcohólica mínima, y deben indicarse las características organolépticas y el sistema de control aplicable a los vinos. En caso de vinos mezcla, al menos el 85 % debe proceder del área de producción de la que lleva el nombre.

Con el Estatuto del Vino de 1932, convertido en Ley en 1933, se introdujo en la legislación española la figura de la D.O. Aunque el concepto no se consolidó hasta la Ley 25/1970, de 2 de diciembre, del Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes. Actualmente existen en España 101 DD.OO.P., de las cuales 72 son DD.OO., 2 son DD.OO.Ca., 19 son Vinos de Pago y 8 son Vinos de Calidad.

### 1.2. D.O.Ca. RIOJA

La D.O. Rioja se reconoció de forma oficial el 6 de junio de 1925, debido a la preocupación de los viticultores y elaboradores riojanos por proteger la identidad, la calidad y la exclusividad de los vinos, convirtiéndose en la primera D.O. de España. El 3 de abril de 1991 obtuvo la distinción de D.O.Ca., siendo la única en España junto a la D.O.Ca. Priorat. El Pliego de Condiciones de la D.O.Ca. Rioja describe los requisitos que tiene que reunir un vino para poder formar parte de dicha Denominación. Entre los principales requisitos se encuentran las características analíticas (graduación, acidez volátil, intensidad colorante, contenido de anhídrido sulfuroso, azúcares reductores, acidez total, pH y sobrepresión en vinos espumosos), las características organolépticas (tipicidad, color, limpidez, olor, sabor y calidad del vino), las prácticas específicas para la elaboración y las restricciones impuestas (prácticas de cultivo, de elaboración y crianza y envejecimiento), la delimitación de la zona geográfica (Rioja Alta, Rioja Alavesa y Rioja Oriental), el rendimiento máximo, las variedades de uva y el vínculo con la zona geográfica (RDGIA, de 5 de Noviembre, 2021). El Consejo Regulador es la entidad que se encarga de que un vino amparado por la D.O.Ca. Rioja cumpla con todos estos requisitos y está integrado por representantes de viticultores, bodegueros y administración.

La D.O.Ca. Rioja está situada al norte de España y se divide en tres grandes zonas: Rioja Alta, Rioja Alavesa y Rioja Oriental (denominada Rioja Baja hasta el año 2017) (*Figura 1.1*). Las condiciones climáticas de la D.O.Ca. Rioja son óptimas para el desarrollo de la vid, con temperaturas suaves y precipitaciones anuales superiores a los 400 L/m<sup>2</sup>. Los suelos disponen de una estructura equilibrada, son ligeramente alcalinos y pobres en materia orgánica. En Rioja Alta predomina el clima atlántico, y los suelos arcillo-calcáreos, arcillo-ferrosos y aluviales; en Rioja Alavesa predomina el clima atlántico y los suelos calcáreos; y en Rioja Oriental

predomina el clima mediterráneo, más seco y cálido, y los suelos aluviales y arcillo-ferrosos (Fuente: Consejo Regulador D.O.Ca. Rioja).



**Figura 1.1.** Mapa de las tres zonas de la D.O.Ca. Rioja: Rioja Alta, Rioja Alavesa y Rioja Oriental (Fuente: <https://www.macrobertandcanals.com/la-tierra-del-rioja/>).

Según las estadísticas de la memoria anual del Consejo Regulador del año 2021, la D.O.Ca. Rioja cuenta con 66.240 ha de viñedo inscrito, divididas en 27.871 ha en Rioja Alta, 25.191 ha en Rioja Oriental y 13.178 ha en Rioja Alavesa. Está formada por 144 municipios de los cuales 118 están en la comunidad autónoma de La Rioja, 18 en la provincia de Álava y 8 en la Comunidad Foral de Navarra. Cuenta con un total de 695 bodegas inscritas, de las cuales 571 tienen registro embotellador, y la constituyen unos 14.300 viticultores.

Las 14 variedades de uva autorizadas por el Consejo Regulador se dividen en cinco tintas y nueve blancas, siendo las tintas: Tempranillo, Garnacha Tinta, Graciano, Mazuelo y Maturana Tinta; y las blancas: Viura, Malvasía, Garnacha Blanca, Tempranillo Blanco, Maturana Blanca, Chardonnay, Turruntés, Sauvignon Blanc y Verdejo. De las 66.217 ha productivas de la D.O.Ca. Rioja, un 91 % pertenecen a variedades tintas (60.247 ha) y un 9 % a variedades blancas (5.970 ha) (Fuente: Consejo Regulador D.O.Ca. Rioja). La variedad tinta más cultivada en la D.O.Ca. Rioja es Tempranillo, siendo un 88 % del total de las

## 1. INTRODUCCIÓN

---

variedades tintas, seguida muy de lejos por Garnacha Tinta (8 %). La variedad blanca más cultivada en la D.O.Ca. Rioja es Viura (68 %), seguida por Tempranillo Blanco (13 %).

A continuación se van a describir las dos variedades de uva (Fuente: Consejo Regulador D.O.Ca. Rioja) con las que se ha trabajado durante esta tesis doctoral.

- Tempranillo Blanco: es una mutación genética natural, a partir de un sarmiento de una cepa de Tempranillo, localizada en 1988 en un viñedo viejo de Murillo de Río Leza (La Rioja). El racimo de esta variedad es de tamaño mediano y suelto, con baya mediana y ligeramente aplastada. La brotación es tardía y el envero y la maduración precoces. Se trata de una variedad de ciclo corto y producción media, que permite elaborar vinos equilibrados y con una elevada concentración en compuestos volátiles con aromas afrutados (Garde-Cerdán, da Costa, et al., 2021; Martínez et al., 2018). Es de color amarillo verdoso, como se puede ver en la *Figura 1.2*.



**Figura 1.2.** Racimo de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco (Fuente: <https://www.riojawine.com/el-rioja/variedades-de-uva/tempranillo-blanco/>).



- Tempranillo: esta variedad tinta es autóctona de la D.O.Ca. Rioja, siendo la más característica, a la vez que la más abundante en esta Denominación. Es capaz de producir vinos con largo envejecimiento, pero muy equilibrados, suaves y afrutados. Es una variedad muy sensible a plagas y enfermedades, poco resistente a la sequía y a las altas temperaturas. Es una variedad temprana, con un ciclo de maduración corto. El racimo es cónico, alargado y grande, y con bayas negro-rojizas, esféricas y medianas (*Figura 1.3*). Actualmente el Tempranillo está extendido por toda España, estando autorizado en 28 DD.OO., y por todo el mundo.



**Figura 1.3.** Racimo de *Vitis vinifera* L. Tempranillo (Fuente: <https://www.riojawine.com/el-rioja/variedades-de-uva/tempranillo/>).

### 1.3. LA MADURACIÓN DE LA BAYA

Existen tres fases en el desarrollo de la baya: la herbácea o de latencia, el envero y la maduración. Durante la fase herbácea se produce la división celular, el aumento del tamaño de los granos y la acumulación principalmente de los ácidos málico y tartárico, los ácidos hidroxicinámicos, los monómeros de tanino, minerales, aminoácidos, micronutrientes y algunos compuestos aromáticos como las metoxipirazinas (Reynier, 2001; Togores, 2006). Esta fase suele durar entre 45 y 65 días tras el final de la floración. Durante el envero se detiene el crecimiento de la baya, se produce el ablandamiento de esta, la coloración y el aumento de azúcares. Esta fase dura entre 12 y 15 días (Togores, 2006; Zoecklein & Gump, 2021) (*Figura 1.4*).



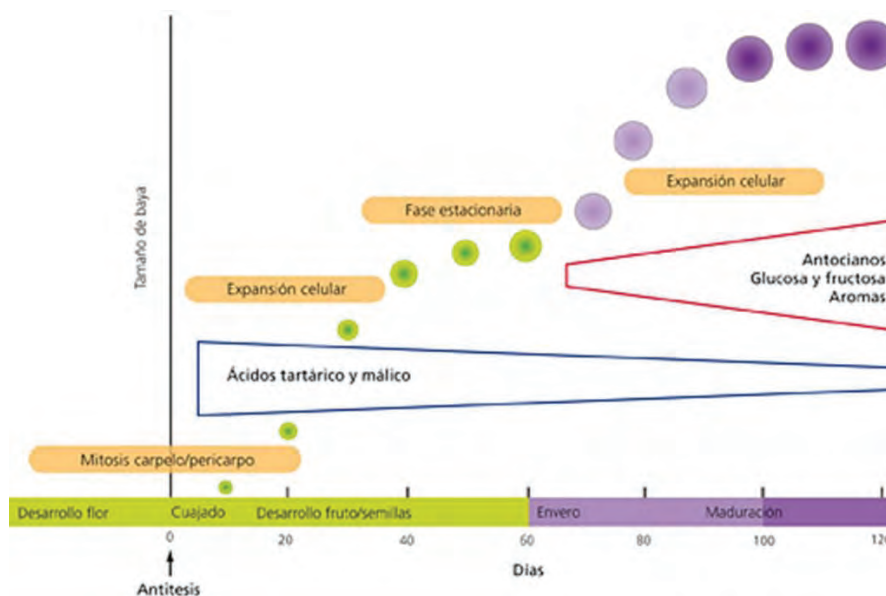
**Figura 1.4.** Racimo de *Vitis vinifera* L. Tempranillo durante el envero.



La fase de maduración se define como el proceso que abarca desde el envero hasta la vendimia. Tiene una duración de 35 a 55 días. Durante la maduración se produce la evolución de seis parámetros principales (Blouin & Peynaud, 2003; Flanzy, 2000; Martínez de Toda, 2007; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2003; Togoires, 2006) (*Figura 1.5*):

- Acumulación de azúcares
- Diminución de la acidez
- Crecimiento del volumen de la baya
- Hidrólisis de ciertos constituyentes, responsables del reblandecimiento del fruto
- Acumulación de taninos y antocianos en la piel (variedades tintas)
- Biosíntesis de los precursores aromáticos

Los azúcares y la acidez están relacionados principalmente con la madurez de la pulpa, mientras que los taninos, antocianos y precursores aromáticos se desarrollan fundamentalmente en la piel. La evolución en la baya de estos compuestos no siempre está sincronizada.



**Figura 1.5.** Evolución de algunos de los constituyentes de la baya durante su maduración (Carbonell Bejerano & Martínez-Zapater, 2013).

### 1.3.1. Tipos de maduración

Se han establecido distintos tipos de maduración en función del constituyente de la baya que se esté midiendo (Blouin & Peynaud, 2003; Moreno-Vigara & Peinado-Amores, 2010):

- Madurez fisiológica: momento en el que las semillas son capaces de reproducir a la planta. Se alcanza justo después del envero. Se caracteriza por tener una acidez muy alta y un bajo contenido en azúcares.
- Madurez vitícola: cuando la vid finaliza su desarrollo vegetativo y toda la actividad clorofílica se centra en el desarrollo de la baya. Las hojas de color verde claro comienzan a agostarse, así como los sarmientos y raspones, que se vuelven más leñosos. En este momento la viña es susceptible al ataque de hongos, insectos o podredumbre.
- Madurez fenológica: cuando la vid ha realizado su ciclo vegetativo normal, es decir, unos 45 días después del envero.
- Madurez industrial/tecnológica: momento en el que la baya alcanza el máximo contenido en azúcares o el mínimo en ácidos (máxima relación azúcar/acidez). Es interesante para los viticultores que venden la uva en función principalmente del contenido en azúcares.
- Madurez aromática: momento en el que la uva presenta el máximo potencial en calidad y cantidad de compuestos aromáticos.
- Madurez enológica: momento óptimo de vendimia que permite elaborar el mejor vino posible. Está relacionada con el resto de madureces.
- Madurez fenólica: relacionada con el contenido de compuestos fenólicos como antocianos y taninos.

### 1.3.2. Factores que afectan a la maduración de la uva

Durante la maduración del racimo, existen factores que afectan a la calidad de la uva y que determinarán las características de la vendimia. Estos factores se clasifican en permanentes, variables, accidentales y modificables (Reynolds, 2021; Togores, 2006; Zoecklein & Gump, 2021).

- Factores permanentes: son aquellos que no se pueden cambiar, como el suelo, el clima, la densidad de plantación, la variedad o el portainjerto.
- Factores variables: son aquellos que varían, pero no por la acción del hombre. Suelen ser factores climáticos como la temperatura, la iluminación y la humedad, y otros factores como la edad del viñedo, etc.
- Factores accidentales: son aquellos que se producen debido a la meteorología, como las plagas, enfermedades, heladas, granizo, vientos fuertes, inundaciones, etc, pudiendo disminuir la calidad y la cantidad de la cosecha. Generalmente se puede actuar contra ellos, con medidas preventivas o curativas.
- Factores modificables: son aquellos en los que puede intervenir el viticultor con el objetivo de corregir o mejorar la calidad de la vendimia. Por este tipo de factores es importante poder realizar el seguimiento de la maduración, para poder actuar de forma rápida y precisa, según las necesidades que tenga nuestro viñedo. Dentro de estos factores se encuentra la poda y otras operaciones en verde, la fertilización, el riego, el manejo del suelo, etc.

### 1.3.3. Seguimiento de la maduración de las bayas

El seguimiento de la maduración es necesario, sobre todo cuando se aproxima su momento óptimo, debido a que, durante la maduración fisiológica de la baya, existe un desacople temporal entre la composición aromática, la composición fenólica y la acumulación de azúcares (Zoecklein & Gump, 2021). Sin embargo, el seguimiento de la maduración es muy complejo, debido a la cantidad de sustancias que intervienen y a que presentan diferentes evoluciones.

Se pueden encontrar varias situaciones vitícolas de maduración (Flanzy, 2000):

- Situaciones tardías: la mayoría de los compuestos que intervienen en la maduración no alcanzan su nivel óptimo. La medida de la concentración de azúcares y el estado sanitario de la uva suelen ser suficientes para determinar la fecha de vendimia.
- Situaciones precoces: al contrario que en las anteriores, durante esta situación se produce una evolución rápida de los componentes de la baya. Existe riesgo de sobrepasar el equilibrio de dichos compuestos y de una sobremaduración, lo que podría producir problemas fitosanitarios. En estos casos conviene tener en cuenta el nivel de acidez y de pH de la uva.
- Situaciones alternativas: es una situación intermedia entre las dos anteriores y varía en función del año. Es necesario proceder con un seguimiento detallado de la maduración para determinar el equilibrio óptimo entre los componentes de la uva (azúcares, ácidos, aromas y compuestos fenólicos). En este caso no se debe prever la madurez únicamente en términos de pH o de azúcares, sin tener información sobre los aromas o compuestos fenólicos, ya que, para una misma cantidad de azúcares, puede variar mucho el equilibrio de los demás compuestos de la uva.

- Situaciones armónicas: este tipo de situaciones son ideales, ya que el equilibrio entre los constituyentes de la uva se presenta de forma natural, siendo relativamente fácil prever el momento óptimo de maduración.

El estudio de la evolución de la maduración de la baya puede dar una idea sobre la calidad y el potencial de la vendimia, ya que la calidad de la uva determinará en un alto porcentaje la calidad del vino (Togores, 2006). Actualmente, el seguimiento de la maduración se basa en la recogida periódica de muestras y en el análisis posterior de los resultados (Ramírez-Pérez & González-Caballero, 2012). Este seguimiento es complicado debido a la gran variabilidad que existe entre las bayas de un mismo racimo, entre distintos racimos de una misma cepa, e incluso entre el mismo racimo de una semana a otra. Los racimos situados más cerca de la cepa presentarán una mayor cantidad de azúcares que los ubicados en el extremo de las ramas, al igual que los más maduros serán los más elevados por encima del suelo. Por este motivo, el seguimiento de la maduración requiere muestreos regulares y representativos, de cantidades suficientes de uva (de 1,5 a 2 Kg), recogidas de distintas partes del racimo y de distintas cepas (Pérez-Juan & Morales-Ordóñez, 1998; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2003).

Una vez llevadas esas muestras al laboratorio, son sometidas a distintos procedimientos, muy largos y tediosos en la mayoría de los casos, donde se cuantificarán los constituyentes de interés, como los azúcares, la acidez o el pH (Ramírez-Pérez & González-Caballero, 2012; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2003). Para el seguimiento de la madurez fenólica en uvas tintas, existen algunos métodos clásicos, entre los que destaca el método de Glories (Glories & Augustin, 1993; González-Neves et al., 2011; Saint-Cricq et al., 1998), aunque la mayoría son largos y tediosos. El seguimiento de la madurez aromática también es muy importante, pero su determinación con un método fácil y rápido no es

## 1. INTRODUCCIÓN

---

posible actualmente, ya que la técnica utilizada para este tipo de análisis es la cromatografía gaseosa, y son necesarios equipos y materiales de los que solo disponen algunos centros de investigación o bodegas muy equipadas, por lo que no es posible todavía realizar un seguimiento rutinario (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, et al., 2003; Togoires, 2006).

El seguimiento periódico de la evolución de los constituyentes más importantes de la uva ha cobrado importancia en los últimos años debido al efecto del cambio climático. El aumento de las temperaturas y la disminución de las precipitaciones ha provocado un desajuste entre los distintos tipos de madurez, sobre todo entre la madurez industrial o tecnológica (aumento de azúcares y disminución de acidez) y la madurez fenólica y aromática (compuestos que se acumulan en la baya de manera más lenta) (Droulia & Charalampopoulos, 2021; Jones et al., 2021; Mira de Orduña, 2010). Este hecho ha provocado que, con el fin de evitar el aumento excesivo del grado alcohólico en el vino, se vendimie antes y no se alcance el contenido adecuado de compuestos fenólicos y aromáticos, determinantes de la calidad.

### 1.3.4. Fecha de vendimia

La fecha de vendimia habitualmente se ha establecido según la experiencia y las costumbres vitícolas de cada zona, ligándose a la madurez industrial o tecnológica de la uva, es decir, al contenido de azúcares y a la acidez. En particular, la concentración de sólidos solubles totales (TSS, *Total Soluble Solids*) sigue siendo el parámetro más utilizado para evaluar la madurez de las bayas (Rolle et al., 2021). Sin embargo, el efecto del cambio climático ha provocado cambios en el desarrollo fenológico de la vid y en los ciclos vegetativos, y como consecuencia, desajustes en la maduración de la uva (Mira de Orduña, 2010). Por este motivo, la fecha de vendimia debe evaluarse cuidadosamente, estableciendo un sistema que permita estimar los distintos tipos de madurez, con el objetivo de

optimizar la calidad de la uva, y por lo tanto, la calidad final del vino (Ramírez-Pérez & González-Caballero, 2012). No existe un nivel de madurez óptimo, sino que existen varios, en función del constituyente de la uva considerado (azúcares, ácidos, aromas, compuestos fenólicos, etc.) y del tipo de vino que se quiera elaborar, de este modo, el momento óptimo de vendimia es el que el viticultor elige para recolectar la uva en función de sus intereses enológicos (Flanzy, 2000). En los últimos años, la consideración de los compuestos aromáticos y fenólicos ha cobrado una mayor importancia. Sin embargo, como se ha comentado en el apartado anterior, el seguimiento rutinario de estos compuestos a lo largo de la maduración de la uva es complicado actualmente, debido a la falta de medios analíticos accesibles y rápidos.

Todos estos motivos ponen en evidencia la necesidad de disponer de herramientas que permitan estimar los distintos componentes de la baya a lo largo de su maduración, de forma rápida, económica y no invasiva, y de este modo escoger la fecha de vendimia disponiendo de la mayor cantidad de información posible.

### 1.4. COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN UVA Y VINO

El aroma del vino es muy complejo ya que está formado por centenares de compuestos volátiles, que se encuentran en concentraciones que varían desde fracciones de ng/L hasta varios mg/L. Además, el umbral de percepción de estos compuestos también es muy variable, por lo que el impacto final que tienen en el aroma del vino depende, en gran medida, de la relación entre la concentración a la que se encuentra el compuesto y su umbral de percepción. El aroma del vino está relacionado con la calidad del mismo, y por lo tanto, con su valor comercial (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003).

La mayoría de los compuestos volátiles son ampliamente conocidos debido al gran número de técnicas analíticas disponibles, y a la mejora de las técnicas cromatográficas. Los constituyentes del aroma del vino se pueden clasificar de acuerdo a su origen en (Flanzy, 2000; Rubio-Bretón et al., 2019; Usseglio-Tomasset, 1998):

- Aromas primarios: formados por aromas varietales y prefermentativos.
  - *Aromas varietales*: proceden de la uva y dependen principalmente de la variedad. Se pueden encontrar de forma libre, es decir, como moléculas volátiles odorantes, o en forma ligada, es decir, como precursores aromáticos no volátiles e inodoros.
  - *Aromas prefermentativos*: se forman durante las etapas que van desde la cosecha hasta el comienzo de la fermentación alcohólica. Se componen principalmente de compuestos de 6 átomos de carbono.
- Aromas secundarios o fermentativos: se forman durante la fermentación alcohólica, debido a la acción de las levaduras, y durante la fermentación maloláctica, si se lleva a cabo, debido a la acción de las bacterias lácticas.



Son productos secundarios del metabolismo de los microorganismos enológicos, siendo los más abundantes cuantitativamente, y los responsables de la nota vinosa común en todos los vinos.

- Aromas terciarios o de envejecimiento: se forman durante el periodo de crianza o envejecimiento, ya sea en botella o en barrica. Durante este periodo, los aromas provenientes de la uva y de la fermentación se transforman muy lentamente en otras sustancias responsables del *bouquet*, el aroma característico de los grandes vinos. En el caso de las barricas, se produce una migración de componentes olorosos de la madera, y la acción del oxígeno combinada con procesos microbiológicos. En el caso de la botella, al ser un recipiente inerte sin contacto con el aire, los cambios son de naturaleza química. Desaparecen componentes odorantes debido a que se alcanza el equilibrio químico, y aparecen otros componentes procedentes de la hidrólisis, combinación o cambios estructurales (Cacho & Ferreira, 2010).

Algunos de los factores que afectan a la composición aromática del vino son: la variedad, el clon, la añada, el *terroir*, la madurez de la uva, las prácticas vitícolas y las operaciones realizadas a la uva antes de la fermentación para los aromas primarios, las condiciones de fermentación para los aromas secundarios, y la crianza y envejecimiento para los aromas terciarios (Alem et al., 2018; Flanzy, 2000; González-Barreiro et al., 2015; Robinson et al., 2014b). Además, la liberación y percepción del aroma depende en gran medida de aspectos físicos y ambientales como la temperatura ( $T^a$ ) del vino al ser servido o la forma de la copa (Cliff, 2001; Styger et al., 2011).

### 1.4.1. Aromas primarios

Los aromas primarios son los que proceden de la uva, y, por lo tanto, dependen de todos los factores explicados en el *Apartado 1.3.2*, como la variedad, las condiciones edáficas y climáticas del viñedo, las prácticas vitícolas, etc. Estos compuestos son los responsables de la madurez aromática de la uva, por lo que, para poder realizar un seguimiento rutinario de este tipo de madurez (*Apartado 1.3.1*), es necesario disponer de una herramienta que nos permita estimar la composición aromática varietal de forma rápida y a lo largo de la maduración. Este es el motivo por el cual nos centramos en este grupo de compuestos aromáticos durante el trascurso de esta tesis doctoral.

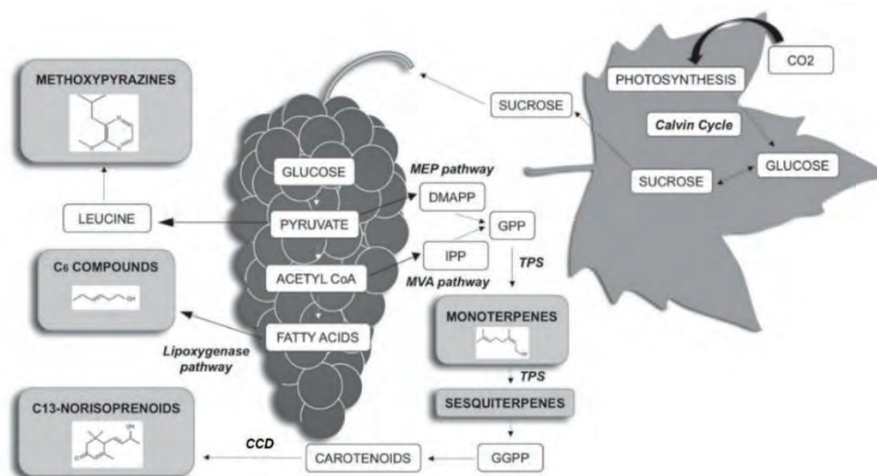
Los metabolitos que conforman el aroma primario se pueden encontrar de forma libre, como moléculas volátiles odorantes, o en forma ligada, como precursores aromáticos inodoros no volátiles. Estos últimos son los más abundantes e importantes (Ferreira & Lopez, 2019). Sin embargo, debido a su complejidad química y bioquímica, no existen métodos capaces de proporcionar una evaluación fiable del potencial aromático de la uva.

El aroma primario libre está formado por una gran cantidad de compuestos volátiles que se pueden agrupar principalmente en metoxipirazinas, terpenos, C<sub>13</sub> norisoprenoides y compuestos C<sub>6</sub> (Alem et al., 2018; Rubio-Bretón et al., 2019).

#### 1.4.1.1. Metoxipirazinas

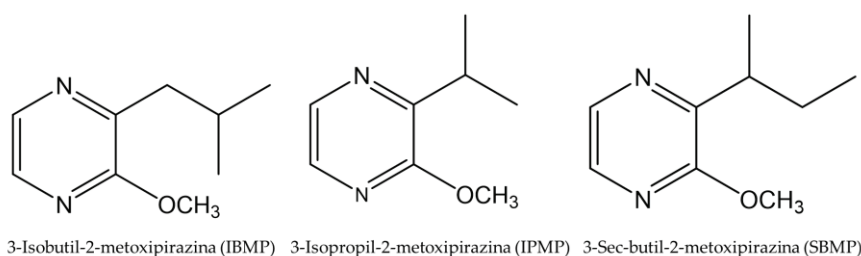
Las metoxipirazinas son heterociclos nitrogenados, pertenecientes al grupo de las pirazinas, que proceden del metabolismo de los aminoácidos (por ejemplo, la 3-isobutil-2-metoxipirazina (IBMP) proviene del metabolismo de la leucina), aunque aún no está clara la vía de síntesis (*Figura 1.6*) (Alem et al., 2018; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003). Las metoxipirazinas se encuentran en la uva como compuestos volátiles libres y son responsables de aromas herbáceos, como

pimiento verde, espárrago y guisante, característicos de bayas poco maduras, solo aceptables en algunos vinos blancos, siendo generalmente perjudiciales en los vinos tintos (Alem et al., 2018). Son compuestos característicos del aroma de vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Sauvignon blanc, Semillon, etc. (Allen & Lacey, 1999; Flamini & Traldi, 2010).



**Figura 1.6.** Vías de síntesis de los principales aromas varietales. DMAPP: dimetilalil pirofosfato; IPP: isopentenil pirofosfato; GPP: geranyl pirofosfato; GGPP: geranylgeranyl pirofosfato; TPS: terpeno sintasa; CCD: dioxigenasa de escisión de carotenoides; MEP: metileritritol fosfato; MVA: ácido mevalónico (Alem et al., 2018).

La IBMP, que es la metoxipirazina más abundante en el vino, la 3-isopropil-2-metoxipirazina (IPMP) y la 3-sec-butil-2-metoxipirazina (SBMP) (Figura 1.7) son las más comunes y extremadamente volátiles, con umbrales de percepción olfativa muy bajos, en el rango de 0,001 - 0,002  $\mu\text{g/L}$  (Darriet et al., 2012; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003; Rubio-Bretón et al., 2019; Togores, 2006). En la baya se localizan principalmente en el hollejo (72 %) y en las semillas (23,8 %), siendo prácticamente inexistentes en la pulpa (4,2 %).

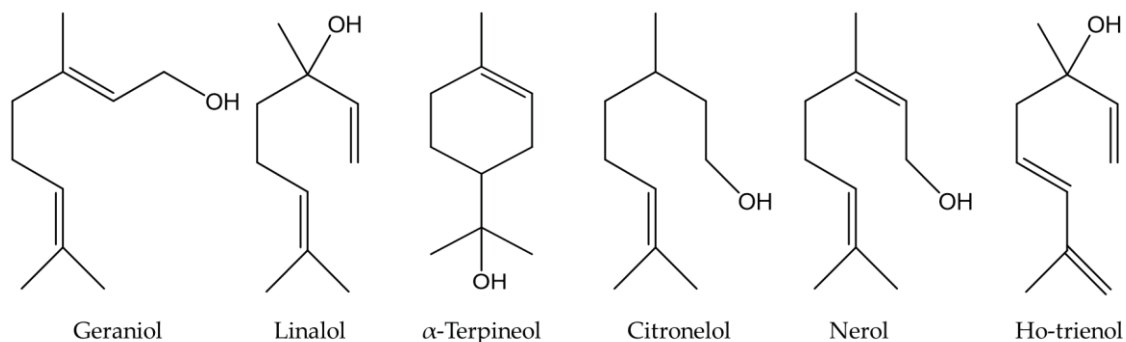


**Figura 1.7.** Estructura de las principales metoxipirazinas encontradas en la uva.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.4.1.2. Terpenos

Los terpenos son una familia amplia de compuestos muy importantes en el reino vegetal, representando uno de los mayores grupos de metabolitos secundarios de las plantas (Alem et al., 2018). Se encuentran en las bayas en forma libre y ligada (glicosilada), siendo la fracción glicosilada más abundante que la fracción libre. Los terpenos se encuentran principalmente en forma de monoterpenos, formados por 10 átomos de carbono, y en forma de sesquiterpenos, formados por 15 átomos de carbono (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003; Togores, 2006). Existen unos 40 compuestos monoterpénicos en las uvas y se pueden encontrar como hidrocarburos simples, aldehídos, alcoholes, ácidos e incluso ésteres, siendo los alcoholes monoterpénicos o terpenoles los más abundantes en la uva. Los terpenoles más comunes y odoríferos son: geraniol, linalool,  $\alpha$ -terpineol, citronelol, nerol y ho-trienol (González-Barreiro et al., 2015; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Estructura de los principales alcoholes monoterpénicos o terpenoles encontrados en la uva.

Los umbrales de percepción de estos compuestos en vino son bastante bajos, oscilando entre decenas y centenas de  $\mu\text{g/L}$ , teniendo un papel muy importante en el aroma varietal, destacando por sus aromas florales (Darriet et al., 2012; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003). Entre los aldehídos terpénicos se pueden encontrar el geranial, el neral o el citronelal, y entre los hidrocarburos terpénicos se encuentran el limoneno, el *p*-cimeno, el  $\alpha$ -terpineno o el mirceno, todos estos

compuestos son menos abundantes y odorantes que los alcoholes monoterpénicos (Togores, 2006). Respecto a la ruta sintética de los terpenos en la baya, se plantean dos vías alternativas, en primer lugar la del ácido mevalónico (MVA) y en segundo lugar la del metileritritol fosfato (MEP) (Alem et al., 2018; Darriet et al., 2012) (*Figura 1.6*).

Los terpenos se sintetizan durante la maduración de la uva y se localizan principalmente en el hollejo de la baya, aunque en las variedades muy aromáticas, como Moscatel, también se pueden encontrar en la pulpa (Rubio-Bretón et al., 2019; Togores, 2006). Los terpenos superan su umbral de percepción en variedades de la familia de la Moscatel y en algunas variedades blancas como Albariño, Gewürztraminer, Chardonnay, etc. Sin embargo, pueden existir efectos sinérgicos entre los distintos terpenos, que los hagan contribuir de forma significativa al aroma, sin necesidad de superar sus umbrales de percepción (Rubio-Bretón et al., 2019).

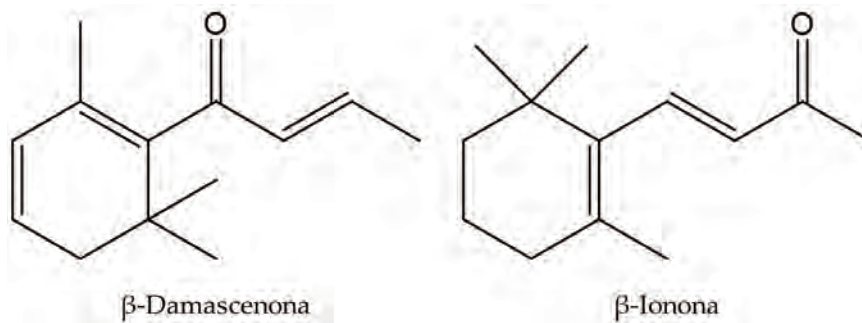
### 1.4.1.3. $C_{13}$ norisoprenoides

Los  $C_{13}$  norisoprenoides son terpenos aromáticos de 13 átomos de carbono que derivan de la degradación oxidativa de los carotenoides, que son terpenos de 40 átomos de carbono (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003; Togores, 2006). Los carotenoides de los que derivan los  $C_{13}$  norisoprenoides son luteína,  $\beta$ -caroteno, neoxantina, flavoxantina, violaxantina, 5,6-epoxiluteína, luteoxantina y zeaxantina (Robinson et al., 2014b; Togores, 2006). Como se puede observar en la *Figura 1.6*, los carotenoides, y por lo tanto los  $C_{13}$  norisoprenoides, comparten ruta metabólica con los monoterpenos y los sesquiterpenos. Puesto que los  $C_{13}$  norisoprenoides son terpenos, también se pueden encontrar en la uva en forma libre o ligada (glicosilada). Desde el punto de vista químico, los  $C_{13}$  norisoprenoides se pueden dividir en formas megastigmanas o no megastigmanas. Los megastigmanos son  $C_{13}$  norisoprenoides que poseen un

## 1. INTRODUCCIÓN

---

esqueleto oxigenado sobre el carbono 7 o sobre el carbono 9 (Alem et al., 2018; Robinson et al., 2014b). Dentro de estos destacan la  $\beta$ -damascenona, característica por su aroma floral y a fruta exótica, la  $\beta$ -ionona, con olor a violeta, y otros compuestos como el 3-oxo- $\alpha$ -ionol, de aroma a tabaco, la 3-hidroxi- $\beta$ -damascenona, de olor a té, y la  $\beta$ -damascona, de aroma afrutado y a tabaco (González-Barreiro et al., 2015; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003; Togores, 2006). La  $\beta$ -damascenona y la  $\beta$ -ionona (*Figura 1.9*) son dos de los C<sub>13</sub> norisoprenoides más abundantes en la uva y presentan un bajo umbral de percepción (0,05  $\mu\text{g/L}$  y 0,09  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente) (Ferreira & Lopez, 2019; Rubio-Bretón et al., 2019), por lo que son capaces de proporcionar al vino sus aromas afrutados y florales. Generalmente, la  $\beta$ -damascenona es más abundante que la  $\beta$ -ionona, aunque la concentración de ambas es muy variable, siendo mayor en variedades aromáticas y en variedades tintas (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003).

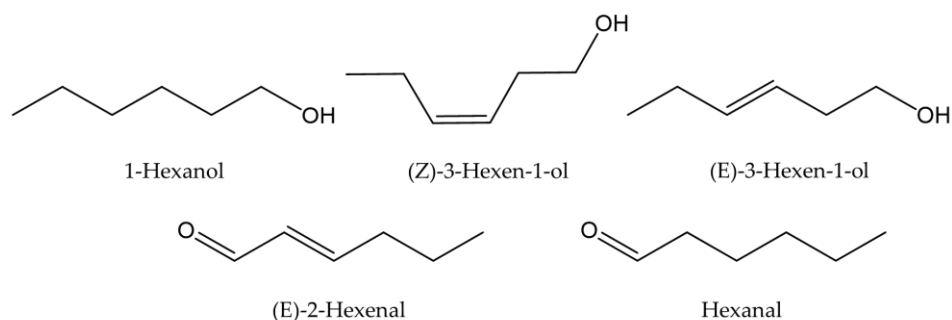


**Figura 1.9.** Estructura de los C<sub>13</sub> norisoprenoides más abundantes en la uva.

Dentro de los no megastigmanos, destacan el TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno), característico por su olor a queroseno, y el vitispirano y los actinodoles, característicos por su olor a alcanfor o eucalipto (Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003; Togores, 2006). Estos compuestos están generalmente ausentes en las uvas y en los vinos jóvenes, formándose fundamentalmente durante el envejecimiento (Darriet et al., 2012; Ribéreau-Gayon, Glories, et al., 2003).

## 1.4.1.4. Compuestos C6

Dentro de los aromas primarios, también se sitúan los compuestos C6, es decir, con 6 átomos de carbono. Se encuentran en las uvas como volátiles libres, y, puesto que su contenido puede aumentar en el momento en que la baya se separa del racimo y en el resto de etapas prefermentativas, se consideran aromas prefermentativos (Rubio-Bretón et al., 2019). Son conocidos como volátiles de hoja verde, debido a su aroma herbáceo y verde, característico de uvas poco maduras. Estos compuestos se pueden encontrar principalmente en forma de alcoholes y aldehídos, pero también en forma de cetonas, ácidos, ésteres y lactonas (Alem et al., 2018). Algunos de los compuestos C6 más característicos en las uvas son el 1-hexanol, (Z) y (E)-3-hexen-1-ol, (E)-2-hexenal y hexanal (Figura 1.10). Estos compuestos derivan principalmente de la oxidación de ácidos grasos por la vía de la lipoxigenasa (Figura 1.6) (Alem et al., 2018; Robinson et al., 2014b). Sus umbrales de percepción oscilan entre las unidades y las decenas de  $\mu\text{g/L}$ , para los aldehídos, y entre las centenas y millares de  $\mu\text{g/L}$ , para los alcoholes (Ferreira & Lopez, 2019; Rubio-Bretón et al., 2019).



**Figura 1.10.** Estructura de los principales compuestos C6 encontrados en la uva.

## 1.4.1.5. Otros compuestos

En la baya, también suelen estar presentes otro tipo de compuestos como los bencenoides, ésteres, ácidos grasos, alcoholes superiores, tioles, etc. Estos se encuentran mayoritariamente como precursores glicosilados y se liberan generalmente durante la fermentación y el envejecimiento (Togores, 2006).



### 1.4.2. Evolución de los aromas primarios a lo largo de la maduración de la uva

La evolución de los aromas primarios a lo largo de la maduración de las bayas está muy influenciada por los factores mencionados en el *Apartado 1.3.2*. Al desarrollo del aroma en la baya a lo largo de su maduración se le propuso el nombre de *engusting*, que significa que la baya está adquiriendo aromas y sabores atractivos (Coombe & McCarthy, 1997; González-Barreiro et al., 2015). Por lo general, cada familia de compuestos volátiles evoluciona a lo largo de la maduración de una forma distinta, ya que unas aumentan y otras disminuyen, pero se puede modular dicha evolución mediante la práctica de distintas técnicas vitícolas (Alem et al., 2018; González-Barreiro et al., 2015; Mendez-Costabel et al., 2014; Robinson et al., 2014b).

Por ejemplo, el nivel de metoxipirazinas en la baya disminuye drásticamente a lo largo de la maduración, siendo mayor su concentración en regiones más frías (Alem et al., 2018; He et al., 2023). La disminución de las metoxipirazinas a lo largo de la maduración es positiva debido a que estas contribuyen negativamente al aroma del vino, proporcionando notas herbáceas y vegetales (Cacho & Ferreira, 2010). Además, las metoxipirazinas son sensibles a la luz, por lo que se encuentran en mayor concentración en racimos sombreados. Es conveniente realizar deshojados totales o parciales, con el fin de reducir el contenido de estas sustancias en la medida de lo posible (Togores, 2006).

Los niveles de alcoholes monoterpénicos aumentan durante el desarrollo de la baya, y algunos, como el  $\alpha$ -terpineol, el citronelol o el linalool, no se encuentran en cantidades apreciables hasta el envero. Sin embargo, dejan de aumentar una vez alcanzado el estado óptimo de maduración, e incluso pueden disminuir en uvas sobremaduras (Flanzy, 2000).

Los C<sub>13</sub> norisoprenoides aumentan desde el envero hasta el final de la



maduración, de la misma forma que descienden los carotenoides (Togores, 2006). Los carotenoides se acumulan antes del envero en el hollejo de la baya y se van degradando a medida que aumenta su exposición a la luz. Por lo tanto, al final de la maduración es cuando se forman los C<sub>13</sub> norisoprenoides (Darriet et al., 2012), observándose que su acumulación comienza antes de la madurez industrial óptima (Rubio-Bretón et al., 2019).

Por último, a pesar de que los compuestos C<sub>6</sub> son considerados prefermentativos, también están presentes en la uva y evolucionan a lo largo de su maduración. Por lo general los aldehídos disminuyen a lo largo de la maduración, mientras que los alcoholes aumentan. Esto supone un efecto positivo en el aroma, debido a que los alcoholes tienen umbrales de percepción más altos, por lo que disminuye la percepción del carácter herbáceo en las bayas más maduras (González-Barreiro et al., 2015; Rubio-Bretón et al., 2019).

### 1.5. TÉCNICAS TRADICIONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN UVA

Como punto de partida para el comienzo de esta tesis doctoral se llevó a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica sobre las técnicas más utilizadas para la extracción y posterior determinación de compuestos volátiles en uva y vino, así como de una nueva técnica, cuyo potencial para la extracción de compuestos volátiles en muestras de comida y bebida puede ser fácilmente transferible a la uva y al vino. Con esta información se escribió un artículo de revisión (Marín-San Román et al., 2020) (*Anexo I*) que nos llevó a elegir las técnicas a optimizar, durante este tesis doctoral, para la extracción de compuestos volátiles en mosto.

Como se ha comentado en el apartado anterior, existen centenares de compuestos volátiles en la uva, que son ampliamente conocidos gracias a las técnicas cromatográficas que se han ido desarrollando a lo largo de los años. La concentración de estos compuestos en la uva es muy amplia, del rango de pocos ng/L a g/L, por lo que, para llevar a cabo su identificación y cuantificación, normalmente es necesaria una etapa de preparación de muestra (extracción, preconcentración, fraccionamiento y aislamiento), previa al análisis cromatográfico (Marín-San Román et al., 2020; Perestrelo et al., 2011; Sánchez-Palomo et al., 2009). La preparación de la muestra es una de las etapas del método analítico que habitualmente más tiempo requiere, siendo un paso crítico, ya que se pueden cometer errores significativos debidos a la pérdida de analitos (Kataoka et al., 2000).

Las técnicas de preparación de la muestra han ido evolucionando en busca de una mayor exactitud, precisión y sensibilidad, y una minimización de los costes, de los disolventes, del volumen de muestra utilizado y del tiempo requerido para

## 1.5. Técnicas tradicionales para la determinación de compuestos volátiles en uva

---

dicha preparación (Marín-San Román et al., 2020; Serrano de la Hoz, 2014). En la actualidad se conocen numerosas técnicas para la extracción de compuestos volátiles en mosto, desde las más antiguas, y ya casi obsoletas para esta función, como la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid - Liquid Extraction*) y la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), hasta algunas más recientes, y muy utilizadas actualmente, como la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*) o la optimizada en el desarrollo de esta tesis doctoral, extracción mediante barrita agitadora absorbente (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) y su variante multi-SBSE (<sup>m</sup>SBSE, *multi-Stir Bar Sorptive Extraction*), también optimizada. Además, en esta tesis doctoral también se ha optimizado una técnica de extracción muy novedosa, que nunca había sido utilizada para la extracción de compuestos volátiles en mosto, conocida como microextracción en fase sólida mediante lámina de malla de carbono o película fina (TF-SPME, *Thin Film -Solid Phase Microextraction*).

El método analítico más utilizado para determinar los compuestos volátiles de la uva y del vino, extraídos mediante las técnicas mencionadas anteriormente, es la cromatografía de gases (GC, *Gas Chromatography*), desarrollada en 1951 (A. T. James & Martin, 1951). En dicha técnica se pueden utilizar varios detectores, pero el más empleado para estudiar los compuestos volátiles de la uva y del vino es el detector de espectrometría de masas (MS, *Mass Spectrometry*), que permite identificar moléculas ionizadas en base a su relación masa/carga ( $m/z$ ) (Robinson et al., 2014a).

### 1.5.1. SBSE-GC-MS

La técnica de SBSE fue introducida por primera vez por Baltussen et al. (1999). Se basa en el uso de una barrita magnética, encapsulada en una cubierta de vidrio revestida de material absorbente, conocida como *Twister*. Como indica el nombre de la técnica, es un proceso de absorción y no de adsorción superficial, es decir, los analitos se absorben en todo el volumen de la fase estacionaria del *Twister*. El proceso se divide en dos pasos principales: la extracción y la desorción (Baltussen et al., 1999; Costa Freitas et al., 2012; Z. Li et al., 2017; Nogueira, 2012, 2015; Prieto et al., 2010).

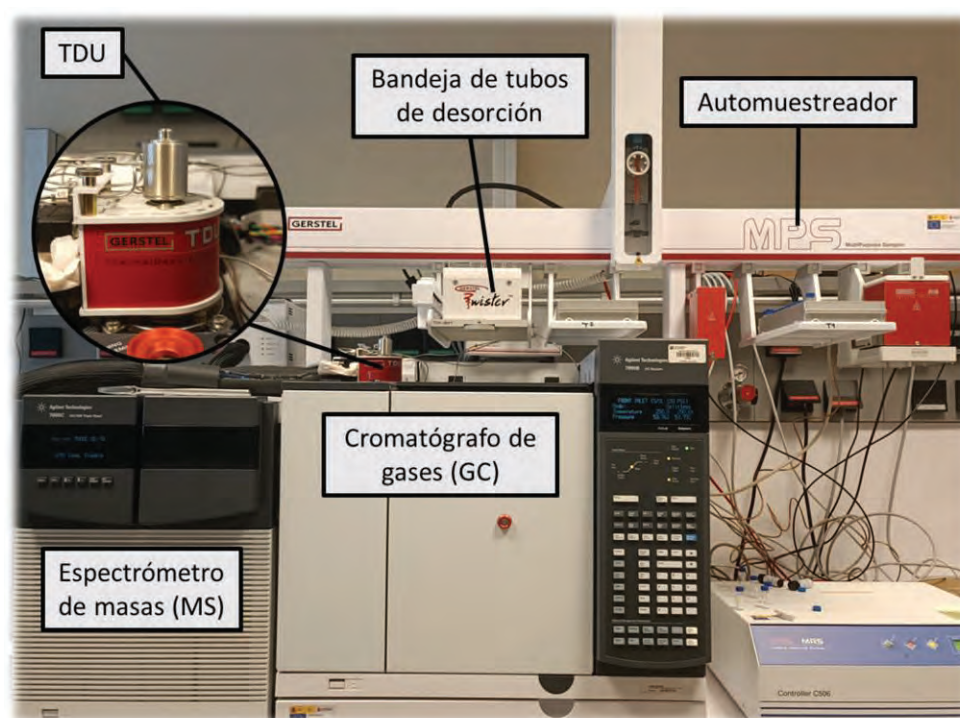
Para llevar a cabo la extracción de los compuestos de interés que se encuentran en la muestra hay que introducir el o los *Twisters* en la misma durante un tiempo determinado. Esto se puede hacer de dos modos, por espacio de cabeza (HS, *Head Space*) o por inmersión directa (DI, *Direct Immersion*) (Costa Freitas et al., 2012; Nogueira, 2015):

- Espacio de cabeza (HS): el *Twister* se introduce en un inserto de vidrio, que se coloca en el HS del vial de extracción. La muestra se agita el tiempo necesario, con un agitador magnético de vidrio de borosilicato, y, a veces, se calienta para facilitar el equilibrio entre la muestra y la fase gaseosa del HS. Se puede utilizar en muestras sólidas, líquidas y gaseosas. Esta técnica es conocida como HS-SBSE.
- Inmersión directa (DI): el *Twister* se introduce directamente en la muestra líquida, por lo que también actúa como agitador magnético. La muestra se agita durante el tiempo necesario para que se produzca el equilibrio entre la muestra y la fase absorbente. También se puede calentar para facilitar dicho equilibrio, aunque no es tan necesario como en HS-SBSE. Esta técnica es conocida como SBSE.

## 1.5. Técnicas tradicionales para la determinación de compuestos volátiles en uva

Una vez extraídos los analitos de interés, el *Twister* se lava con agua destilada y se seca con un papel. Una vez seco, se introduce en el tubo de desorción térmica y se coloca en la bandeja del automuestreador multipropósito (MPS, *Multi Purpose Sampler*), que está acoplado al GC-MS (*Figura 1.11*).

Una vez introducidos los *Twisters* en los tubos de desorción térmica, los compuestos absorbidos en los mismos se desorben térmicamente en la unidad de desorción térmica (TDU, *Thermal Desorption Unit*) (*Figura 1.11*). Para ello, se emplea una rampa de temperatura, se retienen en el sistema de inyección refrigerado (CIS-4, *Cooled Injection System*) mediante un proceso de enfriamiento o crioconcentración (con N<sub>2</sub> líquido o con el dispositivo de enfriamiento criostático (CCD2, *Cryostatic Cooling Device*)), y, finalmente, se transfieren a la columna cromatográfica mediante otra rampa de T<sup>a</sup> programada en el CIS-4.



**Figura 1.11.** Partes de un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS) acoplado a un sistema automuestreador multipropósito (MPS).

SBSE mejora la sensibilidad respecto a SPME, entre 50 y 250 veces, debido a que la cantidad de material absorbente en SBSE es mucho mayor (24-126  $\mu$ L) que

## 1. INTRODUCCIÓN

---

en SPME (0,6  $\mu$ L), por lo que la relación de fase y el contacto de la fase absorbente con los analitos durante la extracción es mayor, lo que permite una extracción más eficiente, y la extracción de volúmenes mayores, convirtiéndola en una técnica muy versátil (Baltussen et al., 1999; Hjelmeland et al., 2016; Z. Li et al., 2017; Marín et al., 2005).

El material absorbente más utilizado para esta técnica es el polidimetilsiloxano (PDMS). Este material tiene carácter inerte, lo que reduce el riesgo de que se formen compuestos sobre su superficie, es fácil de sintetizar, tiene un alto rendimiento de extracción y los productos derivados de su degradación son fácilmente identificables por MS, lo que lo hace un absorbente muy adecuado para la SBSE. El *Twister* de PDMS se puede utilizar decenas de veces sin mostrar signos de degradación física (Nogueira, 2015). La cantidad de material absorbente del *Twister* varía en función de la longitud del mismo, siendo 24  $\mu$ L para el de 10 mm y 126  $\mu$ L para el de 20 mm (Bicchi et al., 2002; Castro-Mejías et al., 2008; Lanças et al., 2009). El PDMS es una fase polimérica apolar, por lo que principalmente absorbe compuestos apolares. Por este motivo se han probado nuevos recubrimientos que permitan resolver el problema de la polaridad, pero solo se ha comercializado el de etilenglicol (EG), que es compatible con la desorción térmica (Ochiai et al., 2018; Serrano de la Hoz et al., 2016). El EG puede unirse a compuestos más polares, sin embargo, no es tan estable como el PDMS, por lo que la vida útil de los *Twisters* de EG es menor (Z. Li et al., 2017). El *Twister* de EG puede colocarse en el HS o fijarse en la pared interior mediante un clip magnético. Sin embargo, no se utilizan por DI, ya que al ser más frágiles que los de PDMS, pueden romperse con mayor facilidad (Ochiai, 2018; Ochiai et al., 2013).

Por todos estos motivos, el mayor inconveniente que presenta la SBSE es el bajo número de materiales absorbentes disponibles (Prieto et al., 2010).

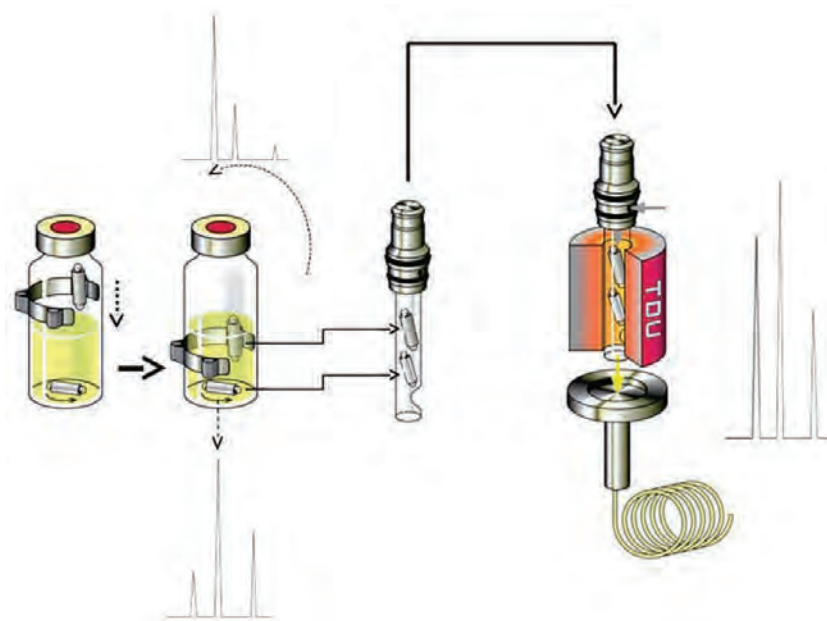
## 1.5. Técnicas tradicionales para la determinación de compuestos volátiles en uva

### 1.5.1.1. *m*SBSE-GC-MS

En los últimos años se ha estudiado una posible combinación de ambos *Twisters*, el de PDMS y el de EG, llamada multi-SBSE (*m*SBSE), con el fin de aumentar el rango de polaridades de los compuestos absorbidos.

*m*SBSE fue desarrollada por Ochiai et al. (2013), siendo la única técnica hasta la fecha que combina dos *Twisters* diferentes. En esta técnica, el *Twister* de PDMS siempre se utiliza por DI y como agitador magnético, mientras que el *Twister* de EG se puede utilizar por DI, sujeto a la pared lateral con una pinza magnética (Ochiai et al., 2013, 2018) (Figura 1.12), y por HS, también sujeto en la pared lateral con la pinza magnética, pero sin tocar la muestra (Berrou et al., 2019), o colocado en cualquier dispositivo para HS (Vyviurska et al., 2022).

La combinación de ambos absorbentes permite cubrir un amplio rango de polaridades de los analitos, y, por lo tanto, aumentar el número de compuestos aromáticos extraídos en comparación con la SBSE convencional (Berrou et al., 2019; Ochiai, 2018; Ochiai et al., 2013).



**Figura 1.12.** Procedimiento de la *m*SBSE propuesto por Ochiai (2018).



## 1. INTRODUCCIÓN

---

Las etapas de extracción y desorción son iguales que en SBSE, pero en este caso ambos *Twisters* se desorben simultáneamente en el mismo tubo de desorción (*Figura 1.12*). Actualmente existen muy pocos trabajos en los que se utilice la <sup>m</sup>SBSE (Berrou et al., 2019; Ochiai, 2018; Ochiai et al., 2013) y solo uno la emplea en uva o vino (Vyviurska et al., 2022).

### 1.5.2. TF-SPME-GC-MS

TF-SPME fue descrita por primera vez por Bruheim et al. (2003) con el objetivo de mejorar la sensibilidad de métodos anteriores como SPME o SBSE. El dispositivo para la TF-SPME consiste en una lámina de malla de carbono (*TF, Thin Film*) (20 mm x 4,8 mm) impregnada con una fase absorbente. En este caso, dicha fase se compone de más de un material absorbente, con el objetivo de solventar el problema que presenta la SBSE respecto a la polaridad de los analitos a extraer. Actualmente existen láminas de PDMS/divinilbenceno (PDMS/DVB), de PDMS/carboxeno (PDMS/CAR) y de PDMS/balance hidrofílico-lipofílico (PDMS/HLB) (Kfoury, Whitecavage, et al., 2021; Vernarelli et al., 2019). La principal ventaja que presenta la TF-SPME frente a la SPME tradicional es que utiliza un mayor volumen de fase extractiva, con una mayor superficie absorbente y un menor grosor. Tener un mayor volumen de fase implica un aumento en la sensibilidad, mientras que tener una mayor superficie absorbente y un menor grosor hace que se alcance más rápidamente el equilibrio de extracción. Por lo que, si se añade un volumen de fase absorbente muy grande sobre una lámina ultrafina, dará lugar a una cinética de extracción más rápida (Huang et al., 2020; Olcer et al., 2019).

La TF puede ser utilizada por HS o por DI. En el modo HS, la TF se coloca sobre la muestra sólida o líquida, en un vial cerrado. En el modo DI, la TF se coloca directamente dentro de una muestra líquida (Marín-San Román et al., 2020; Stuff et al., 2018). Tanto por HS como por DI, la muestra se somete a



## 1.5. Técnicas tradicionales para la determinación de compuestos volátiles en uva

---

agitación con un agitador magnético de vidrio de borosilicato. Una vez terminada la extracción, la TF se limpia con agua destilada y se seca con un papel. Una vez seca, se introduce en el tubo de desorción y se coloca en la bandeja del GC-MS, desorbiéndose los compuestos siguiendo el mismo procedimiento que el explicado para SBSE (*Apartado 1.5.1*).

TF-SPME ha sido utilizada para la extracción de compuestos aromáticos en alimentos y bebidas (Kfoury, Whitecavage, et al., 2021; Stuff et al., 2018; Vernarelli et al., 2019), demostrándose que presentaba numerosas ventajas frente a SPME y SBSE. Sin embargo, nunca había sido utilizada para la extracción de compuestos volátiles en mostos de uva, lo que impulsó a la optimización de esta novedosa técnica, para dicho fin, en el trascurso de esta tesis doctoral.

### 1.6. MÉTODO CLÁSICO PARA LA MEDIDA DE LOS SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES EN MOSTO

Los sólidos solubles totales (TSS) de los mostos constituyen el conjunto de sustancias presentes, diferentes al agua, que se encuentran en la muestra en fase líquida. En los mostos refleja la influencia de los compuestos disueltos más pesados que el agua (azúcares, ácidos, sales, etc.) (Pérez-Juan & Morales-Ordóñez, 1998).

La determinación de los TSS en el mosto es esencial, ya que proporciona una medida del grado de madurez de la uva y permite conocer su concentración en azúcares para estimar el grado alcohólico probable (Pérez-Juan & Morales-Ordóñez, 1998). Al inicio de la maduración (hasta el envero), los TSS en la uva están formados principalmente por ácidos, que van disminuyendo a lo largo de la maduración, donde aumentan los azúcares.

La determinación de los TSS se efectúa a menudo por una medida física directa como la densimetría o la refractometría (*Figura 1.13*). Una de las principales ventajas que presenta la refractometría frente a la densimetría es la mínima cantidad de muestra que se utiliza y el menor tiempo necesario para su determinación. Los resultados se pueden expresar en distintas unidades, aunque la más extendida es el  $^{\circ}\text{Brix}$ , que se define como gramos de sólidos solubles totales / 100 g de mosto.



**Figura 1.13.** A) Refractómetro portátil para la medida de los sólidos solubles totales directamente en el viñedo. B) Medida de la densidad de un mosto en la bodega.

La concentración óptima de componentes deseables en la uva como el aroma o los compuestos fenólicos, rara vez coincide con la concentración óptima de TSS, de ser así, la determinación de la madurez óptima sería una tarea fácil. Por este motivo, como ya se ha indicado en el *Apartado 1.3.4*, es necesario desarrollar una herramienta que permita estimar el contenido de TSS y el de otros compuestos de la uva, como los compuestos aromáticos y/o fenólicos, de forma simultánea, rápida, no invasiva y a lo largo de su maduración, y de este modo disponer de una mayor información a la hora de fijar la fecha de vendimia.

### 1.7. MÉTODOS NO INVASIVOS

Para garantizar la calidad del producto final, en este caso del vino, es necesario tomar las decisiones de forma rápida, por lo que se requiere de analizadores de procesos y herramientas de control en tiempo real (explicadas a continuación), así como de nuevas herramientas multivariantes para el diseño experimental y el análisis de datos (*Apartado 1.8*) (Amigo et al., 2013).

Tanto las técnicas tradicionales para la medida de los compuestos aromáticos (*Apartado 1.5*), como las de medida de los TSS (*Apartado 1.6*), requieren varias etapas como son: la recogida de muestras, la preparación de las mismas, la extracción de los compuestos (en el caso de los compuestos aromáticos), medidas instrumentales sofisticadas (a menudo inaccesibles para el viticultor y/o el enólogo). Además, no ofrecen información en tiempo real, lo que dificulta, en muchos casos, el seguimiento correcto de la maduración de las bayas.

Estos problemas se podrían resolver con la implementación de técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS, *Near Infrared Spectroscopy*) y la imagen hiperespectral (HSI, *Hyperspectral Imaging*). Estas nuevas metodologías de medida no invasiva disminuyen las operaciones respecto a las técnicas tradicionales, reduciendo el tiempo de medida y la instrumentación (puesto que se trata de técnicas con las que se pueden medir varios parámetros de forma simultánea), evitando la pérdida de muestra (se realizan con la baya intacta), reduciendo costes y proporcionando información en tiempo real. Además, estas técnicas le permitirían al viticultor realizar seguimientos de la maduración de forma periódica, y, por lo tanto, poder tomar decisiones sobre las prácticas vitícolas (*Apartado 1.3.2*) a emplear con el fin de modular la evolución de los parámetros o constituyentes de la baya, así como definir la fecha de vendimia de una forma más precisa y con la mayor cantidad de información posible. Por otro lado, la instalación de un espectrómetro de

infrarrojo cercano (NIR, *Near Infrared*) y/o de una cámara hiperespectral en la bodega permitiría separar las uvas en diferentes depósitos de fermentación en función de su calidad o características enológicas, y así poder elaborar vinos con distintos atributos y calidades.

### 1.7.1. Espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS)

La luz y la visión se han relacionado desde hace miles de años. Los antiguos griegos ya postulaban que los ojos emitían rayos que permitían que las cosas fueran vistas. En 1800, William Herschel diseñó un espectrómetro en el que el sol servía como fuente de radiación, con un prisma como elemento dispersor y un termómetro como detector. En primer lugar midió el calor radiante en la región del visible (VIS), y al desplazar el termómetro más allá del extremo rojo del espectro, se dio cuenta de que la  $T^a$  era superior a la de la región VIS, suponiendo esto el descubrimiento de un espectro no visible, y del primer espectrómetro de NIR (Ciurczak et al., 2021; Herschel, 1800; Shaw & Mantsch, 2016). Sin embargo, no fue hasta 1912 cuando Fowle publicó el primer trabajo de una medida cuantitativa por NIRS, seguido por Ellis y Bath en 1938 y por Barchewitz en 1940. 150 años más tarde de su descubrimiento, Wilbur Kaye en 1950, Goddu en 1960 y Kermit Whetsel en 1968, responsables de asentar las bases de la espectroscopía analítica, analizaron el estado del arte, encontrando únicamente 50 trabajos en los que se utilizaba la NIRS para realizar medidas cuantitativas (Ciurczak et al., 2021; Shaw & Mantsch, 2016). Ya en 1980, los investigadores comenzaron a publicar de forma exponencial, hasta alcanzar casi las 3.000 publicaciones de NIRS en 1997 (McClure, 2003).

Las aplicaciones de la NIRS se pueden organizar cronológicamente en: era de los descubrimientos, 1800-1939; era de la definición y la visión, 1940-1959; era de la agricultura, 1960-1979; era de la quimiometría, 1980-1989; era de la industria, 1990-1999; y era de la imagen, 2000 en adelante (McClure, 2003).

## 1. INTRODUCCIÓN

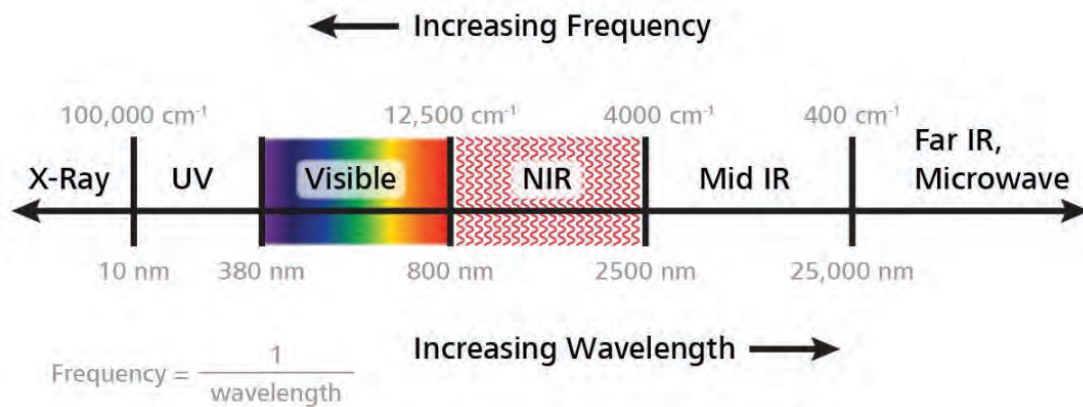
---

La seguridad alimentaria cada vez recibe más atención por parte de la sociedad, ya que está relacionada con la salud de las personas. La NIRS es un método no destructivo y rápido que, en la última década, se ha aplicado a la evaluación de la calidad de los alimentos (Cen & He, 2007; L. Wang et al., 2017; X. Wang, 2019). Sus principales ventajas son un análisis rápido y no destructivo, buena reproducibilidad y bajo coste. Debido a estas características que presenta la NIRS, las muestras pueden ser utilizadas para análisis posteriores, es una técnica respetuosa con el medio ambiente, requiere poca o ninguna preparación de la muestra, puede medir distintos constituyentes de forma simultánea, proporciona información en tiempo real, se puede utilizar para materiales muy diversos, etc. (Fernández-Navales, 2009; Marten et al., 1989; Williams & Norris, 2001).

Por otro lado, la NIRS también presenta algún inconveniente, por ejemplo, debido a la gran cantidad de datos espectrales, así como al solapamiento de algunas bandas de absorción, es necesario el empleo de la quimiometría para sintetizar los datos y simplificar su interpretación. Otra de las limitaciones de la NIRS es que necesita un método de referencia que permita relacionar la información espectral con las medidas cuantitativas y/o cualitativas proporcionadas por el método de referencia (Ciurczak et al., 2021; Fernández-Navales, 2009; Shenk & Westerhaus, 1995; Williams & Norris, 2001). Asimismo, a la hora de llevar a cabo la adquisición de espectros, existen numerosos factores externos que pueden influir, como la humedad del ambiente, la temperatura, la luz, etc.

## 1.7.1.1. Fundamentos teóricos de la NIRS

La NIRS se basa en las distintas propiedades de absorción de los principales componentes químicos de una muestra, lo que sirve para diferenciarlos. La suma de estas propiedades de absorción, combinada con las propiedades de dispersión de la propia muestra, determina la reflectancia difusa. Tratando de forma adecuada dicha reflectancia se puede obtener información sobre la composición de la muestra (Marten et al., 1989). Se trata de una técnica espectroscópica vibracional molecular basada en la absorción producida cuando la longitud de onda ( $\lambda$ ) de la radiación electromagnética vibra a la misma frecuencia específica que los enlaces moleculares que forman los componentes de la muestra analizada (Fernández-Novales, 2009). El rango espectral del NIR se sitúa entre la región VIS y la región del infrarrojo (IR), es decir, entre 780 nm y 2.526 nm (*Figura 1.14*).



**Figura 1.14.** Espectro electromagnético (Fuente: <https://scancotec.com/blog/beneficios-de-la-espectroscopia-nir-parte-2/>).

Los enlaces moleculares encargados de producir la absorción de la radiación son del tipo C-H, N-H y O-H, y dicha absorción se produce debido a las vibraciones y movimientos de plegado, alargamiento o deformación de dichos enlaces (J. L. Li et al., 2016; X. Wang, 2019). De este modo, las frecuencias de absorción se pueden relacionar con un tipo de enlace en particular, por lo que se puede construir un espectro que se comporte como una huella dactilar de la muestra (Cen & He, 2007). En resumen, se pueden observar señales en los

## 1. INTRODUCCIÓN

---

espectros NIR de los distintos compuestos químicos, debidas a las vibraciones y movimientos moleculares (Siesler, 2016).

La región NIR se divide en NIR de onda corta (SW-NIR, *Short Wave-Near Infrared*) (800-1.300 nm) y NIR común a partir de 1.300 nm. Las bandas presentes en los espectros de IR corresponden a diferentes transiciones entre niveles vibracionales. Las transiciones energéticas permitidas no solo se observan en bandas de frecuencias fundamentales, sino también como sobretonos y combinaciones de bandas (Siesler, 2016; Zamora, 2013). Las absorciones fundamentales dan lugar a las bandas de mayor intensidad, y son transiciones vibracionales desde el estado fundamental hasta el primer estado excitado ( $\nu$ ). Los sobretonos son las transiciones vibracionales que van desde el estado fundamental hasta estados excitados superiores ( $2\nu$ ,  $3\nu$ ). Las bandas de combinación aparecen a una nueva frecuencia que es el resultado de la suma de dos o más absorciones fundamentales ( $\nu_{\text{comb}} = \nu_1 + \nu_2$ ). Las bandas de diferencia, al igual que las de combinación, dan lugar a una nueva frecuencia como resultado de la diferencia entre dos o más absorciones fundamentales ( $\nu_{\text{comb}} = \nu_1 - \nu_2$ ). Algunos sobretonos y bandas de combinación pueden dar lugar a bandas tan intensas como alguna absorción fundamental cercana, lo que provoca el acoplamiento de ambas, dando lugar a la resonancia de Fermi (Siesler, 2016). La región SW-NIR se considera la banda de absorción de los sobretonos altos (3, 4, 5, ...), mientras que la región NIR pertenece al primer y segundo sobretono. A medida que aumenta el sobretono, disminuye la intensidad de absorción (Cen & He, 2007; Siesler, 2016). En la *Figura 1.15* se puede observar la distribución de los principales sobretonos producidos por los enlaces orgánicos en la región NIR.



14286	12500	11111	10000	9090	8333	7692	7143	6666	6250	5882	5556	5263	5000	4762	4545	4348	4168	4000	cm <sup>-1</sup>		
700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000	2100	2200	2300	2400	2500	nm		
																			Bonds		
4	3						2					C									
**	**						****					****							H <sub>2</sub> O		
**	**						****					*****							ROH		
**		***							**					*****							NH <sub>2</sub>
								***					****							CONH <sub>2</sub>	
								***					****							CONHR	
5	4	3						2					2					C			
**	***		**						**					**					****	****	ArCH
***	***		*****		****				*****					*****	*****				*****	CH <sub>3</sub>	
***	***		*****		****				*****					*****	*****				*****	CH <sub>2</sub>	
***	***		*****		****				*****					*****	*****				*****	CH	
												Grease Acid							CH <sub>2</sub>		
						**					**	*****				*****	Others				
						Acid				SH Acid				C=O				CHO Fat			

**Figura 1.15.** Distribución de sobretonos y combinación de sobretonos de los principales enlaces orgánicos en la región NIR. “=”: posición de absorción de los enlaces; “C”: combinación de tonos; “2, 3, 4, 5”: primer, segundo, tercer y cuarto sobretono. “ArCH”: enlace C-H en los grupos aromáticos (Cen & He, 2007).

Según la ley de Lambert-Beer (*Ecuación 1.1*), las composiciones químicas de los alimentos y la intensidad de las bandas de absorción están correlacionadas positivamente. Por lo que la mayoría de productos químicos y biológicos presentan absorciones únicas que pueden utilizarse para análisis cualitativos y cuantitativos (X. Wang, 2019).

La ley de Lambert-Beer (*Ecuación 1.1*),

$$Absorbancia = K \cdot c \cdot l = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde  $K$  es el coeficiente de absorción molecular,  $c$  la concentración de moléculas absorbentes,  $l$  el paso óptico de la luz a través de la muestra,  $I_0$  la intensidad de la radiación sobre la muestra,  $I_t$  la intensidad de la energía transmitida y  $T$  la transmitancia de la muestra.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

### 1.7.1.2. Instrumentación de la NIRS

Los instrumentos constituyen un pilar fundamental en la NIRS. Estos han ido evolucionando desde los simples equipos basados en filtros y dispersores con rejillas de difracción, hasta espectrómetros mucho más sofisticados. A pesar de que la NIRS estuvo durante mucho tiempo poco explorada, a partir de las décadas de 1980-1990, se produjo una revolución en el uso de la NIRS como técnica analítica. Este hecho impulsó el desarrollo de una gran variedad de espectrómetros NIR (Shaw & Mantsch, 2016). En función de la aplicación, los espectrómetros NIR se pueden dividir en espectrómetros de laboratorio, portátiles y en línea. En los últimos años se han desarrollado sistemas NIR portátiles para su fácil uso sobre el terreno (Ye et al., 2023).

En general, un espectrómetro NIR está formado por los siguientes componentes (*Figura 1.16*):

- Fuente de iluminación: es la encargada de iluminar la muestra, se dividen en fuentes de banda ancha (térmicas), que producen radiación que abarca la región espectral continua, y fuentes de banda estrecha (no térmicas), emiten dentro de una banda espectral estrecha, y se utilizan principalmente en sistemas de bajo coste, portátiles o específicos de esa  $\lambda$ . Las lámparas halógenas de wolframio (tungsteno) son baratas y pueden ofrecer una alta intensidad en el NIR. Conviene tener especial cuidado con las variaciones en la intensidad de luz, por lo que suele ser necesaria una configuración del espectrómetro para compensar las posibles fluctuaciones (Cen & He, 2007; Shaw & Mantsch, 2016).
- Divisor de haz o dispositivo para la discriminación de las longitudes de onda: desempeña un papel muy importante en el espectrómetro NIR, ya que se utiliza para convertir la luz multicolor, en luz monocolor. Es decir,

permiten el paso de forma selectiva de  $\lambda$  discretas. Algunos de los dispositivos para discriminar longitudes de onda más utilizados son el filtro de luz, el interferómetro y las rejillas (Cen & He, 2007).

- Sistema de presentación de la muestra: lugar donde se coloca la muestra, y se produce la interacción entre la radiación NIR y el producto analizado. Depende mucho del tipo de muestra, por lo que el diseño correcto del mismo es crítico para obtener información espectral de calidad (Fernández-Navales, 2009; Shaw & Mantsch, 2016; Zamora, 2013).
- Detector o detectores: generalmente son semiconductores fotosensibles que producen una señal de tensión proporcional a la intensidad de la luz que reciben. Los detectores más comunes empleados en los instrumentos modernos son los basados en semiconductores como arseniuro de galio e indio (InGaAs), sulfuro de plomo (II) (PbS), arseniuro de indio (InAs), etc. El de PbS es el más ampliamente utilizado ya que cubre el rango de 900-2.600 nm. Para medidas de transmisión en sólidos, el más utilizado es el de InGaAs refrigerado, que muestra una muy buena detección en la región de 1.100-1.750 nm (Pasquini, 2018).
- Procesador o expendedor de la señal: suele tratarse de un ordenador que dispone del *software* necesario para la adquisición de datos.

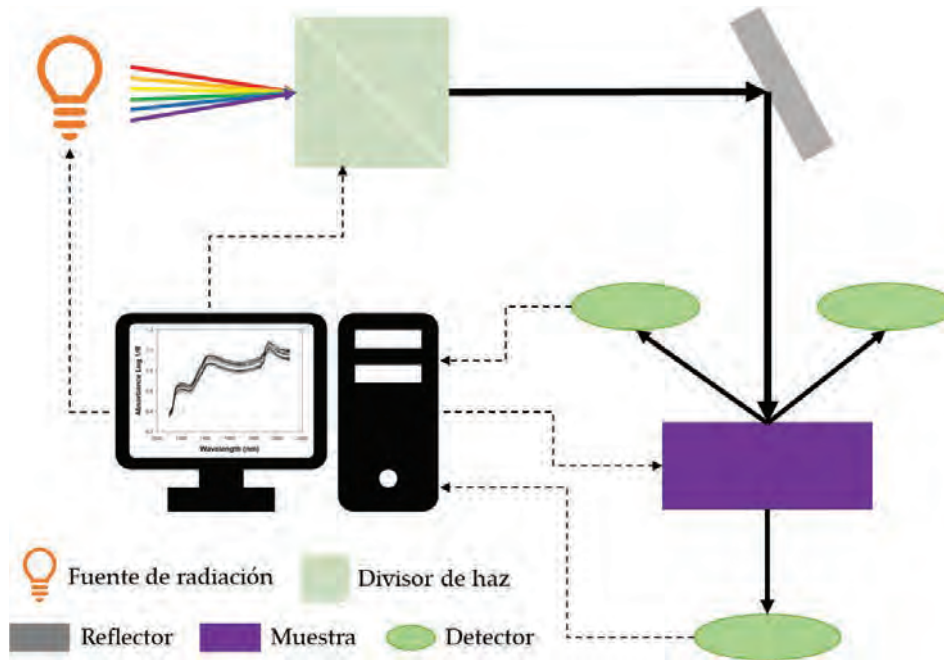


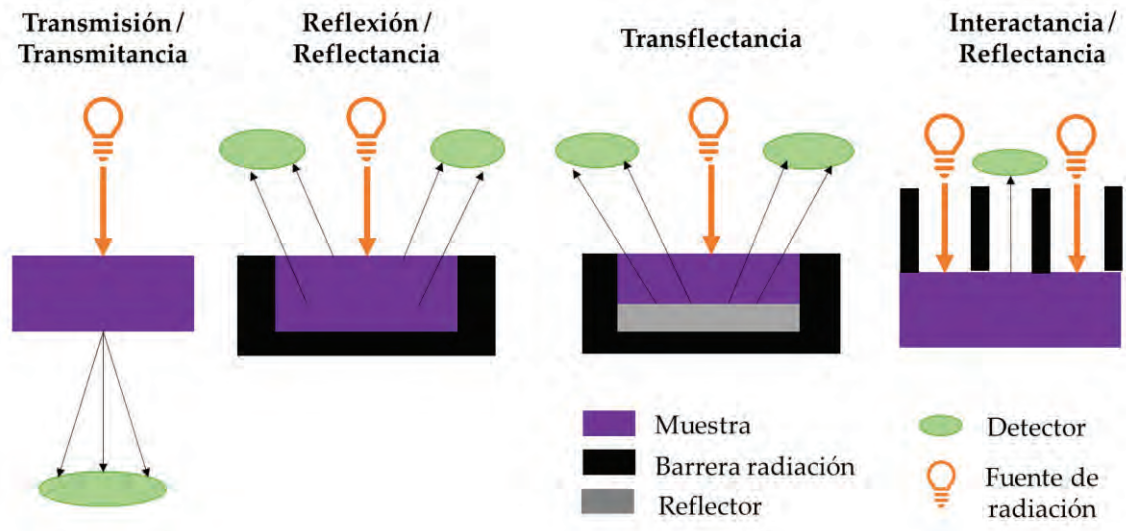
Figura 1.16. Partes de un espectrómetro NIR (adaptado de X. Wang, 2019).

### 1.7.1.3. Adquisición y detección de la NIRS

La detección de la radiación NIR absorbida por la muestra se realiza mediante la medida de la transmitancia, reflectancia, interactancia y transflectancia, dependiendo de la muestra que se vaya a medir, de los constituyentes a analizar y de la posición de los detectores (Figura 1.17) (Kawano, 2002; J. L. Li et al., 2016; Osborne et al., 1993):

- Transmitancia: mide la radiación que atraviesa una muestra. Se utiliza para gases, líquidos, semilíquidos y sólidos.
- Reflectancia: mide la radiación reflejada desde la superficie de la muestra. Se usa para sólidos y semisólidos.
- Transflectancia: la radiación se transmite a través de la muestra, se refleja en una placa de reflexión difusa (reflector) y a continuación se vuelve a transmitir a través de la muestra, pero en dirección contraria. Se usa principalmente para líquidos y semilíquidos.

- **Interactancia:** solo detecta la luz transmitida a través de la muestra, ya que la luz incidente es forzada a entrar en la muestra antes de llegar al detector, implica la iluminación y la detección en puntos separados lateralmente en la superficie de la muestra. Se utiliza principalmente para muestras sólidas y semisólidas.



**Figura 1.17.** Formas de detección de análisis NIR para muestras agroalimentarias (adaptado de Kawano, 2002).

### 1.7.2. Imagen hiperespectral (HSI)

La HSI es otra alternativa a las técnicas de análisis tradicionales, ya que, como se ha mencionado a lo largo del *Apartado 1.7*, es una técnica no destructiva, de respuesta rápida, que proporciona una gran cantidad de información del producto y aplicable a todas las fases de producción del producto. Además, permite evaluar de forma precisa y simultánea diferentes parámetros en muestras distintas y procesar la información en tiempo real (Chávez-Segura & Vejarano, 2021).

Los inicios de la HSI se remontan al siglo XIX, cuando el astrónomo P.J.C. Janssen utilizó un monocromador de doble rendija para observar la corona solar. Dicho monocromador era el único medio para obtener espectros de banda

## 1. INTRODUCCIÓN

---

estrecha, obteniéndose la imagen girando el dispositivo rápidamente mientras se observaba la rendija de salida. De este modo, ajustando la posición relativa de la rendija de salida con respecto a la dispersión del prisma, se podía ver la misma escena a diferentes  $\lambda$ . Tres décadas más tarde, Fabry y Perot desarrollaron su filtro interferométrico, que por primera vez permitía ver una escena completa a una banda espectral estrecha y ajustar la  $\lambda$  del filtro. Esto les permitió construir representaciones del objeto con dimensiones  $(x, y, \lambda)$ , aunque de forma muy laboriosa (Hagen & Kudenov, 2013).

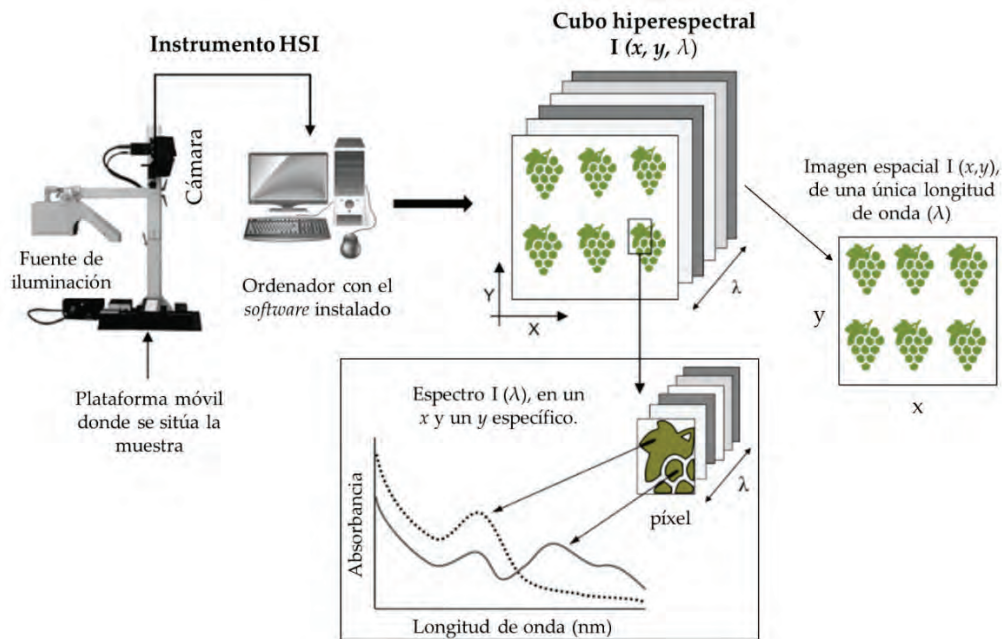
### 1.7.2.1. Fundamentos teóricos de la HSI

Mientras que la NIRS proporciona una gran resolución espectral (muchas  $\lambda$ ), pero en un área espacial relativamente reducida, las imágenes hiperespectrales (HSI) combinan el potencial de la espectroscopía (gran resolución espectral), con la información que proporciona un espacio bidimensional, como puede ser una imagen (Ye et al., 2023). Este hecho permite evaluar la composición interna de la muestra (espectroscopía), así como sus características externas (imagen) (Chávez-Segura & Vejarano, 2021; Wu & Sun, 2013). En HSI, cada píxel de una imagen completa representa un espectro completo en un rango electromagnético específico ( $> 100 \lambda$ ) (*Figura 1.18*). De este modo se puede obtener información de datos tridimensionales (3D) de la muestra, incluyendo la información espectral unidimensional (1D) y la información espacial (imagen) bidimensional (2D), lo que es útil para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa de la muestra (Amigo et al., 2013; Wu & Sun, 2013; Ye et al., 2023).

En la *Figura 1.18* se muestra el esquema típico de HSI, donde las imágenes obtenidas son cubos hiperespectrales tridimensionales (hipercubos), que comprenden cientos de imágenes de una misma muestra a diferentes  $\lambda$ , así como información espacial bidimensional de  $x$  filas e  $y$  columnas, en las que el espectro de cada píxel puede utilizarse para caracterizar una región específica de la



muestra (Chávez-Segura & Vejarano, 2021; Wu & Sun, 2013).



**Figura 1.18.** Esquema de la imagen hiperespectral (HSI) (adaptado de Chávez-Segura & Vejarano, (2021)).

El hipercubo consiste en una serie de subimágenes contiguas, una detrás de la otra, a diferentes  $\lambda$  (Figura 1.18). Cada subimagen proporciona la distribución espacial de la intensidad espectral a una determinada  $\lambda$ . Por lo que una imagen hiperespectral descrita como  $I(x, y, \lambda)$  se puede ver como una imagen espacial separada  $I(x, y)$  en una  $\lambda$  específica, o como un espectro  $I(\lambda)$ , en un  $x$  y un  $y$  específico (píxel individual) (Figura 1.18) (Wu & Sun, 2013).

HSI puede combinarse con distintas técnicas espectroscópicas, las cuales cubren diferentes rangos de  $\lambda$ , como VIS, SW-NIR, NIR, IR medio (MIR) (2.500 - 25.000 nm), que es la región que va desde el NIR hasta el IR lejano (FIR) (Figura 1.14), y espectroscopía Raman, que se basa en la dispersión inelástica de la luz monocromática, y sirve para determinar la composición química y la estructura molecular de una muestra. Los más comunes para la medida de calidad y seguridad de los alimentos son los sistemas visible + infrarrojo cercano de onda corta (VIS+SW-NIR) que cubren el rango de 400-1.000 nm, que es el sistema

## 1. INTRODUCCIÓN

---

utilizado en esta tesis doctoral (ElMasry, Kamruzzaman, et al., 2012; Tahir et al., 2019).

### 1.7.2.2. Instrumentación de la HSI

Existe una gran cantidad de cámaras hiperespectrales que se diferencian principalmente en el mecanismo para la adquisición de las imágenes y en el rango espectral que cubren. Una cámara hiperespectral consta principalmente de los siguientes módulos (*Figura 1.18*) (Amigo, 2010; Gendrin et al., 2008; Wu & Sun, 2013; Ye et al., 2023):

- Fuente de iluminación: generan luz como portadora de información para excitar o iluminar el objeto, y son una parte esencial de los sistemas de inspección óptica. Puede ser una lámpara halógena de wolframio (tungsteno), diodos emisores de luz, láseres y fuentes de luz sintonizables. Las lámparas halógenas son las más utilizadas para la iluminación en el VIS y en el NIR.
- Divisor de haz o selector de longitudes de onda: son filtros sintonizables, utilizados para seleccionar  $\lambda$  específicas, espectrómetros de transformada de Fourier (FT), que registran varias  $\lambda$  simultáneamente, o rejillas de difracción, que eliminan la luz parásita. Son importantes para los sistemas de imágenes hiperespectrales que utilizan una fuente de iluminación de banda ancha en diferentes  $\lambda$ .
- Detectores de área: formados principalmente por las cámaras con dispositivo de carga acoplada (CCD, *charged-couple device*) y de semiconductor complementario de óxido metálico (CMOS, *complementary metal-oxide-semiconductor*). Estas cámaras son detectores bidimensionales de estado sólido, que recogen simultáneamente la información espectral y espacial. El silicio (Si), el InGaAs y el telurio de mercurio y cadmio



(HgCdTe), son tres de los materiales más usados para imágenes hiperespectrales.

- Sistema de presentación de la muestra: espacio en el que se sitúa la muestra de la cual se va a adquirir la señal. Suele ser una plataforma móvil.
- Procesador o expedidor de la señal: suele ser un ordenador equipado con el *software* de análisis pertinente.

Todos ellos deben estar cuidadosamente seleccionados y adaptados entre sí, para un análisis espectral concreto. Por lo que el diseño de su configuración y calibración requiere de un buen conocimiento de la técnica, para poder adquirir imágenes hiperespectrales de alta calidad.

#### 1.7.2.3. Adquisición y detección de la HSI

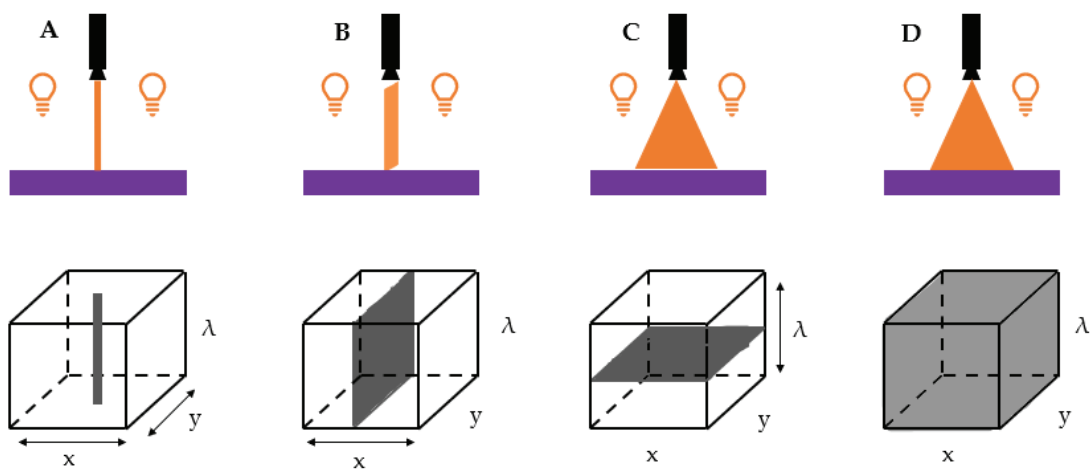
Existen cuatro modos de adquisición de imágenes hiperespectrales (*Figura 1.19*): dos espaciales (*whiskbroom* y *pushbroom*), uno espectral (escaneo de área) y uno espacial-espectral (método de disparo único o *snapshot*) (ElMasry, Barbin, et al., 2012; Hagen & Kudenov, 2013; Wu & Sun, 2013):

- Modo de escaneo de puntos o *whiskbroom*: se escanea un único punto en un píxel para obtener el espectro de ese punto, y se escanean otros puntos moviendo el detector o la muestra a lo largo de las dimensiones  $x$  e  $y$  (*Figura 1.19A*). Este método requiere mucho tiempo para posicionar la muestra y necesita un *hardware* muy avanzado.
- Modo de escaneo de líneas o *pushbroom*: registra una línea completa de una imagen, así como la información espectral correspondiente simultáneamente a cada píxel espacial de la línea. Para obtener el cubo hay que moverse a lo largo de la dimensión  $x$  (*Figura 1.19B*). Este método es adecuado para los sistemas de cintas transportadoras que se suelen

## 1. INTRODUCCIÓN

utilizar en las líneas de procesamiento de alimentos, siendo el método más popular.

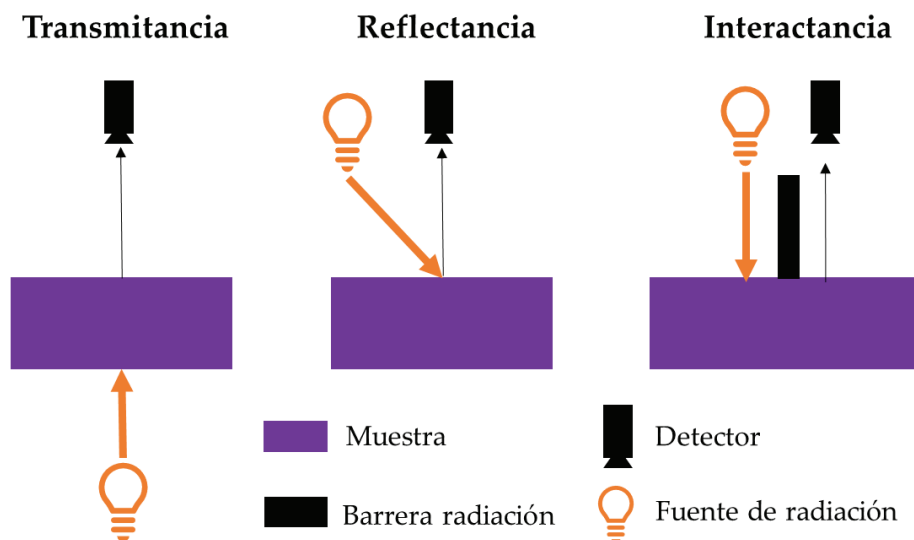
- Modo de escaneo de área o de longitud de onda: este enfoque mantiene fijo el campo de visión de la imagen, y requiere una imagen en 2D ( $x, y$ ) con información espacial completa en una única  $\lambda$  cada vez. El barrido se repite a lo largo de todo el rango de  $\lambda$  (Figura 1.19C). Este escaneo no necesita mover ni la muestra ni el detector, y es adecuado para aplicaciones en las que el objeto debe permanecer inmóvil.
- Método de disparo único o *snapshot*: utiliza un detector de área grande con una sola exposición para capturar imágenes (Figura 1.19D), lo que lo hace muy adecuado para cuando se necesita una rápida obtención de imágenes hiperespectrales.



**Figura 1.19.** Modos de adquisición en imagen hiperespectral (HSI). A) escaneo por puntos; B) escaneo de líneas; C) escaneo de áreas; D) disparo único (adaptado de Wu & Sun, (2013)).

Por otro lado, en HSI existen tres modos de detección, dependiendo de la posición de la fuente de luz y del detector óptico: transmitancia, reflectancia e interactancia (Figura 1.20) (ElMasry, Kamruzzaman, et al., 2012; Wu & Sun, 2013; Ye et al., 2023).

- **Transmitancia:** el detector se sitúa al lado opuesto de la fuente de iluminación y capta la energía transmitida a través de la muestra, por lo que transporta información interna muy valiosa, pero de muy baja intensidad. Se suele utilizar para determinar la concentración de determinados componentes internos, así como para detectar defectos internos en materiales relativamente transparentes.
- **Reflectancia:** el detector se sitúa en el mismo lado que la fuente de iluminación, de este modo, este capta la luz reflejada por la muestra. Mediante el modo de reflectancia se detectan características externas como el tamaño, la forma, el color, la textura, los defectos externos, etc.
- **Interactancia:** la fuente de iluminación y el detector se sitúan en el mismo lado de la muestra y paralelos entre sí. El modo de interactancia capta información más profunda de la muestra y capta menos características superficiales que el modo de reflectancia.



**Figura 1.20.** Modos de detección en imagen hiperespectral (HSI) (adaptado de ElMasry, Kamruzzaman, et al. (2012); y de Wu & Sun, (2013)).

### 1.8. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

La quimiometría engloba un conjunto de herramientas que utilizan la matemática, la estadística y la informática, para procesar los datos generados por los métodos químicos, y así maximizar la extracción de información útil (D. Wang et al., 2022).

Antes de llevar a cabo el análisis quimiométrico hay que extraer la información espectral proporcionada por la NIRS y la HSI. Tanto la NIRS como la HSI necesitan una corrección con una imagen de referencia en blanco, y otra en negro, para normalizar las medidas espectrales y eliminar las señales de ruido aleatorias causadas por la iluminación, la temperatura, la humedad, etc. Además, en HSI es necesario seleccionar la región o regiones de interés (ROI), y extraerlas usando enmascaramiento (eliminar los píxeles que no interesan estableciendo su intensidad en cero) para eliminar el fondo y las zonas de la imagen que no se quieren adquirir (Amigo et al., 2013; Ye et al., 2023). Una vez extraída la información espectral, se lleva a cabo el análisis quimiométrico.

La aplicación de técnicas quimiométricas adecuadas es necesaria para poder extraer la información significativa a partir de los datos espectrales obtenidos por la NIRS y la HSI. En la NIRS existen varias bandas de combinación y sobretonos para una misma molécula (*Figura 1.15*), lo que provoca el solapamiento de las mismas, por lo que es necesaria la aplicación de pretratamientos de la señal así como el análisis multivariante (Gutiérrez-Salcedo, 2019; Pérez-Marín, 2005). En HSI, el hipercubo contiene una gran cantidad de información, tanto espectral como espacial, por lo que también es necesario reducir la cantidad de datos, aplicando pretratamientos de la señal y realizando análisis multivariante.

### 1.8.1. Pretratamientos espectrales

Como se ha indicado en el apartado anterior, una vez obtenida la información espectral de la NIRS y la HSI, deben realizarse pretratamientos espectrales con el fin de eliminar diversos componentes o efectos no deseados como el ruido aleatorio de alta frecuencia, la desviación de la línea base, la interferencia de otras fuentes de luz, la dispersión (*scattering*), el efecto del tamaño de las partículas o artefactos del detector (Amigo et al., 2013; Pasquini, 2018; Ye et al., 2023).

Los pretratamientos tradicionalmente más utilizados son:

- Promediado de espectros: se emplea para reducir el ruido aleatorio de alta frecuencia, aumentando de este modo la relación señal/ruido. Se promedia un número determinado de espectros individuales, dando como resultado un espectro final con menos contribución del ruido (Fernández-Navales, 2009).
- Variable normal estándar (SNV, *Standard Normal Variate*): es una transformación orientada a filas, que centra y escala espectros individuales (Wu & Sun, 2013). Se utiliza para minimizar la dispersión (*scattering*) asociada a cambios en la distribución del tamaño de las partículas, causando efectos aditivos y/o multiplicativos, alterando el perfil espectral y contribuyendo a la variabilidad del conjunto de datos brutos (Barnes et al., 1989; Cen & He, 2007; Pasquini, 2018). También se emplea para reducir la variabilidad espectral debida a los desplazamientos de la línea base (Wu & Sun, 2013).
- Ajuste de línea base o *De-Trending* (DT): este pretratamiento tiene en cuenta la variación en el desplazamiento de la línea base y la curvilinealidad (regresión no lineal) (Barnes et al., 1989). Permite ajustar el espectro original a una función cuadrática y la sustrae de ese mismo

espectro, de este modo elimina la curvatura ascendente característica a altas  $\lambda$ .

- Derivadas: minimizan la dispersión (*scattering*), eliminan los efectos de desplazamiento de la línea base y mejoran la selectividad (Pasquini, 2018). Se utilizan principalmente la primera y la segunda derivada. La primera derivada elimina solo los desplazamientos de la línea base, llamados efectos aditivos. La segunda derivada elimina tanto los desplazamientos de la línea base como los términos que varían linealmente con la  $\lambda$ , llamados efectos multiplicativos, y también tiene la función de resolver los picos cercanos y mejorar la resolución espectral (Cen & He, 2007; Rinnan et al., 2009; Wu & Sun, 2013). Existen dos algoritmos para derivar: el de Norris-Williams (Norris & Williams, 1984) y el de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964), ambos incluyen un suavizado previo a la derivación.
- Suavizado: se utiliza para disminuir el ruido de los datos espectrales, sin reducir el número de variables espectrales y sin corregir el efecto de la dispersión (*scattering*) (Amigo et al., 2013; Wu & Sun, 2013). También es necesario para optimizar la relación señal/ruido. Es muy importante elegir el tamaño de ventana de suavizado adecuado (Cen & He, 2007). Los métodos más habituales son los basados en filtros de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964) y en la FT.

Es frecuente realizar combinaciones de pretratamientos (SNV-DT, DT-SNV, SNV-1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> derivada, 1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> derivada-suavizado, etc.) que permiten eliminar en mayor medida el ruido espectral, así como el efecto de la dispersión (*scattering*). Sin embargo, estas técnicas pueden eliminar información almacenada en la señal espectral, por lo que es necesario estudiar y probar distintas estrategias y combinaciones, hasta encontrar la más adecuada para el grupo de muestras.

### 1.8.2. Análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*)

Antes de llevar a cabo el análisis multivariante es necesario simplificar la gran cantidad de información obtenida a un número reducido de variables, sin pérdida relevante de información. La mayoría de las técnicas espectroscópicas presentan una alta correlación espectral entre las  $\lambda$ ,  $y$ , para poder desarrollar un modelo de calibración multivariante, es necesario que las variables usadas sean linealmente independientes. El PCA permite condensar el gran volumen de información y eliminar el problema de la alta colinealidad entre las  $\lambda$  de una misma muestra.

PCA halla direcciones que explican la máxima variabilidad de las muestras y las utiliza como nuevos ejes de coordenadas, denominados componentes principales (PCs, *Principal Components*). De este modo, un espacio de  $k$  dimensiones queda reducido a un espacio de  $a$  dimensiones, siendo  $a < k$ , sin afectar a la información relevante del sistema (Romero-Gamero, 2001).

De este modo, PCA descompone la matriz de datos espectrales ( $D$ ) (el hipercubo de datos espectrales en el caso de HSI) en tres matrices: una de *scores* ( $T$ ), otra de *loadings* ( $P$ ) y un residual ( $E$ ), dando la siguiente ecuación (*Ecuación 1.2*) (Amigo, 2010; Riccioli, 2011):

$$D = TP^T + E \quad \text{Ecuación 1.2}$$

Se denomina *loading* ( $P$ ) al peso de la contribución de cada variable original en cada PC. Los *loadings* ( $P$ ) pueden proporcionar información sobre la composición química de la muestra. Los *scores* ( $T$ ) son las coordenadas de la muestra en el nuevo espacio definido por los PCs. Los *scores* ( $T$ ) agrupan las muestras según su similitud y detectan muestras con valores extremos. Por último, la matriz

## 1. INTRODUCCIÓN

---

residual o de error (E) contiene la parte de la varianza no explicada por los nuevos ejes (Riccioli, 2011).

Cada PC contiene información de diferente relevancia, siendo el PC1 el que explica la máxima variabilidad de los datos, el PC2 el segundo que más variabilidad explica, y así sucesivamente. Por este motivo, los últimos PCs pueden omitirse sin una gran pérdida de información, ya que estos explican una pequeña parte de la varianza, normalmente relacionada con el ruido o error experimental (Riccioli, 2011). De este modo, el conjunto de datos (D) queda definido por un nuevo conjunto de variables (PCs), no correlacionadas entre sí, en un nuevo sistema de ejes ortogonales (Romero-Gamero, 2001).

### 1.8.3. Modelos de regresión o calibración multivariante

El análisis de datos incluye métodos cualitativos y cuantitativos. Para el primer caso, se realiza un análisis de clasificación multivariante, que permite discriminar entre diferentes características del producto. Para el análisis cuantitativo, se realiza un análisis de regresión o calibración multivariante, relacionando la información de la imagen espectral y las propiedades de la muestra, lo que permite determinar parámetros concretos de la misma.

La mayoría de técnicas quimiométricas para el análisis cuantitativo, o calibración multivariante, se basan en métodos de ajuste lineales, entre las que destacan: la regresión lineal múltiple (MLR, *Multiple Linear Regression*), que relaciona la señal con la concentración de cada componente mediante un ajuste por mínimos cuadrados sin reducir el número de variables; la regresión en componentes principales (PCR, *Principal Component Regression*), que descompone los datos mediante un PCA ([Apartado 1.8.2](#)) y relaciona la nueva matriz de datos (D) con la matriz de valores de referencia que contiene la información de la concentración de cada componente (Y), con el inconveniente de que solo usa la



información espectral para calcular las nuevas variables (Fernández-Novales, 2009; Massart et al., 1988); la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS, *Partial Least Squares*), similar a PCR pero teniendo en cuenta tanto los valores espectrales como los valores de referencia para el cálculo de las nuevas variables (Fernández-Novales, 2009; Shenk & Westerhaus, 1995); y por último, la regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS, *Modified Partial Least Squares*), que es la utilizada en esta tesis doctoral.

MPLS es una modificación de PLS que también permite la obtención de modelos espectro-químicos que relacionan la información espectral de las muestras, obtenida por NIRS y por HSI, con los valores químicos, de compuestos volátiles y de TSS, proporcionados por los métodos de referencia (TF-SPME-GC-MS y refractometría, respectivamente). MPLS, al igual que PCR y PLS, descompone la matriz de datos mediante PCA (*Apartado 1.8.2*) y establece una regresión lineal entre la nueva matriz de datos obtenida (D) y la matriz de valores de referencia (Y), obteniéndose unas variables auxiliares llamadas variables latentes (LV, *Latent Variables*). Para ello asume que la información espectral es función de unas pocas variables, por lo que tiene en cuenta los valores espectrales y los valores de referencia (Romero-Gamero, 2001; Shenk & Westerhaus, 1995).

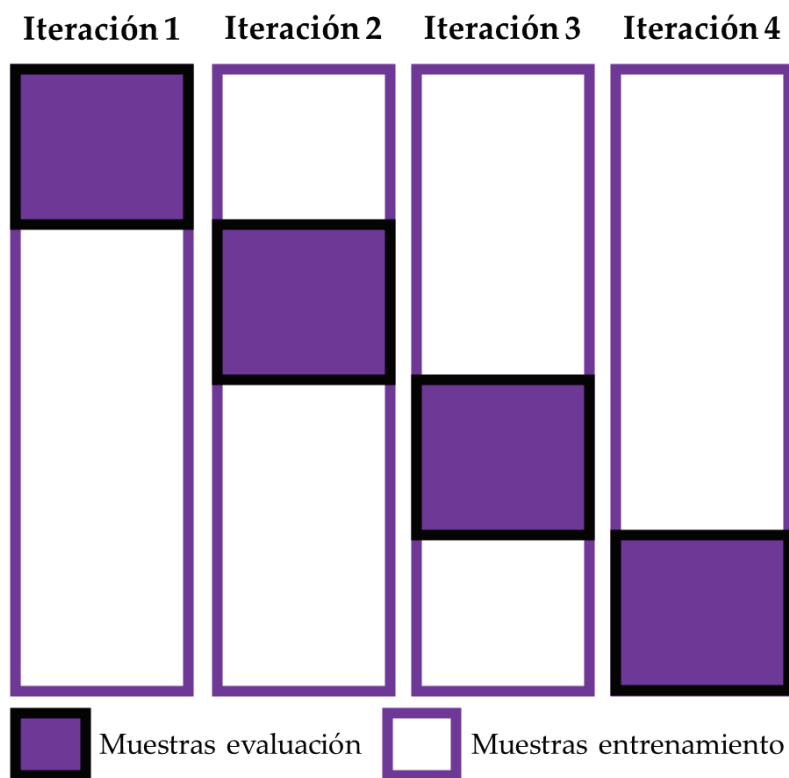
La modificación que presenta la regresión MPLS frente a la regresión PLS es que, en MPLS, los residuos obtenidos en cada  $\lambda$  después de calcular cada factor se dividen entre la desviación estándar (SD, *Standard Deviation*) de los residuos a esa  $\lambda$  (estandarización) antes de calcular el siguiente factor. Este hecho convierte a la regresión MPLS en un método más estable y preciso que la PLS (Shenk & Westerhaus, 1995).

El número óptimo de LV se determina utilizando la regresión MPLS, junto con la validación cruzada (CV, *Cross-Validation*). La forma más común de CV es la *k-fold*, que consiste en dividir el colectivo de calibración en varios grupos *k* (4, 5, 6,

## 1. INTRODUCCIÓN

---

...) dependiendo del número de muestras. El modelo se construye tantas veces como número de grupos se elija ( $k$ ), utilizando en cada iteración un grupo de evaluación diferente y el resto ( $k-1$ ) como grupo de entrenamiento con los que se va a calcular la regresión o modelo de calibración. De este modo, todas las muestras del colectivo de calibración se emplean para calibrar (muestras de entrenamiento) y para validar (muestras de evaluación) (Figura 1.21) (Fernández-Novales, 2009; Romero-Gamero, 2001). Al finalizar las  $k$  iteraciones, se calcula el promedio de los resultados de precisión y error obtenidos para cada subconjunto de prueba (Laura-Ochoa, 2019). El principal objetivo de la CV es evitar el sobreajuste u *overfitting* que puede ocurrir al construir el modelo con un único conjunto de datos (Shenk & Westerhaus, 1995).



**Figura 1.21.** Esquema de validación cruzada  $k$ -fold de un conjunto de muestras divididas en 4 bloques ( $k = 4$ ).

## 1.8.3.1. Evaluación de la capacidad predictiva del modelo de calibración

El objetivo principal de la regresión MPLS con CV es obtener una ecuación o modelo de calibración, para cada parámetro (compuestos volátiles o TSS en este caso), que permita estimar el valor de dicho parámetro en muestras desconocidas, y que este valor estimado difiera lo menos posible del valor real. Para la evaluación de una ecuación o modelo de calibración se suelen utilizar dos conjuntos de muestras: el conjunto de calibración y el de predicción. El conjunto de calibración es el que se emplea para el cálculo de la ecuación de regresión o construcción del modelo de calibración (MPLS y CV). El conjunto de predicción son muestras desconocidas, que no han intervenido en el cálculo de la ecuación de regresión o construcción del modelo de calibración, y que se utiliza para realizar la predicción externa (Figura 1.22). Es decir, el conjunto de predicción se utiliza para evaluar si la ecuación de regresión o modelo de calibración calculado (con el conjunto de calibración) es eficaz para predecir, en muestras desconocidas, el parámetro para el que se ha calculado esa ecuación o modelo.

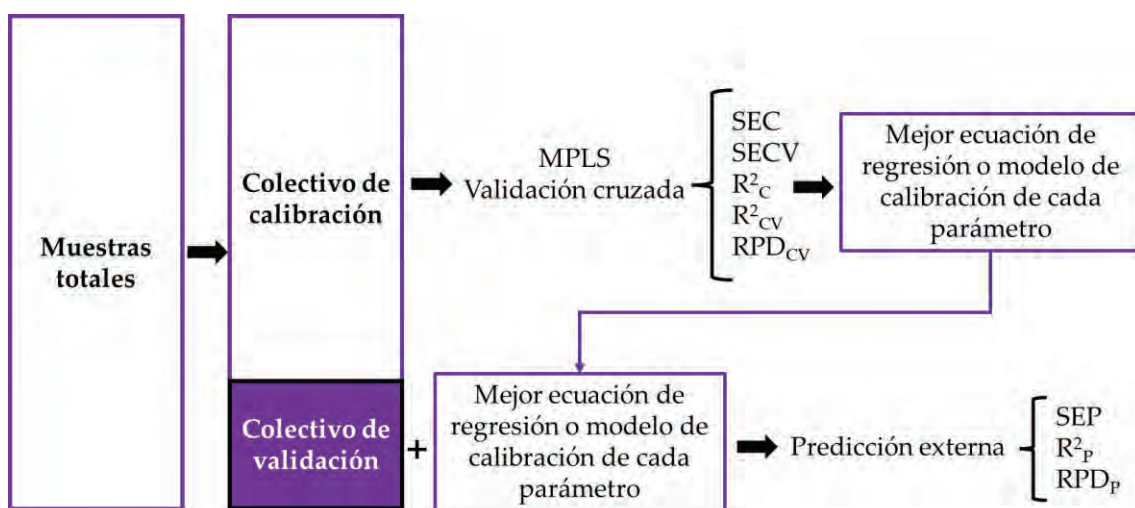


Figura 1.22. Esquema de la evaluación de la capacidad predictiva de la ecuación de regresión o modelo de calibración calculado.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Para elegir la mejor ecuación de regresión o modelo de calibración se utilizan los siguientes estadísticos:

- Error típico (SE, *Standard Error*): describe cómo se ajustan las muestras al modelo. Puede ser error típico de calibración (SEC, *Standard Error of Calibration*) y error típico de validación cruzada (SECV, *Standard Error of Cross-Validation*).
  - *Error típico de calibración (SEC)*: indica únicamente cómo se ajustan los valores de referencia del conjunto de calibración al modelo, por lo que no es un buen predictor de la precisión del modelo (Shenk & Westerhaus, 1996). Es el resultado de la siguiente ecuación (*Ecuación 1.3*):

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - LV - 1}} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

donde  $y_i$  es el dato de referencia de la muestra  $i$  del colectivo de calibración,  $\hat{y}_i$  es el valor estimado por la ecuación calculada del modelo de calibración para la muestra  $i$  del colectivo de calibración,  $N$  es el número de muestras del colectivo de calibración y  $LV$  es el número de variables latentes usadas en el modelo.

- *Error típico de validación cruzada (SECV)*: indica cómo se ajustan los valores del conjunto de evaluación al modelo construido con el conjunto de entrenamiento ( $k-1$ ). El SECV promedio será la media ponderada de los  $k$  SECV obtenidos en las  $k$  iteraciones de la CV. Es la mejor estimación individual de la capacidad de predicción de un modelo (Shenk & Westerhaus, 1996). Es el estadístico utilizado para elegir el número de LV, ya que el SECV disminuye al aumentar el

número de LV, hasta que llega un momento en el que los nuevos LV solo explican ruido, y el SECV comienza a aumentar debido al sobreajuste. El número de variables óptimo es el que proporciona el menor SECV. Es el resultado de la siguiente ecuación (*Ecuación 1.4*):

$$SECV = \frac{1}{k} \sum \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Ecuación 1.4}$$

donde  $k$  es el número de grupos de evaluación en el que se divide el conjunto de calibración,  $y_i$  es el dato de referencia para la muestra  $i$  del grupo de evaluación (*Figura 1.21*),  $\hat{y}_i$  es el valor predicho por el modelo de entrenamiento para la muestra  $i$  del grupo de evaluación y  $N$  es el número de muestras del grupo de evaluación.

- Coeficiente de determinación ( $R^2$ ): porcentaje de la variación existente en el grupo de calibración que puede ser explicado por la regresión (a partir de los datos espectrales) (*Ecuación 1.5*). Según Shenk & Westerhaus (1996), un  $R^2 \geq 0,9$  indica una información cuantitativa excelente, un  $R^2$  entre 0,89 y 0,7 indica una buena información cuantitativa, un  $R^2$  entre 0,69 y 0,5 indica una buena separación de las muestras en valores altos, medios y bajos, un  $R^2$  entre 0,49 y 0,3 indica una buena separación de las muestras en valores altos y bajos y un  $R^2$  menor que 0,29 no es más que una conjetura.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad \text{Ecuación 1.5}$$

donde  $y_i$  corresponde al valor de referencia de la muestra  $i$  del colectivo que se esté evaluando,  $\hat{y}_i$  corresponde al valor estimado por el modelo de entrenamiento para la muestra  $i$  del colectivo que se esté evaluando e  $\bar{y}$  es la media aritmética de los datos de referencia del colectivo que se esté evaluando.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Dentro del colectivo de calibración se pueden calcular el coeficiente de determinación de calibración ( $R^2_c$ ), que es el porcentaje de la varianza explicada por la regresión para el colectivo de calibración, o de validación cruzada ( $R^2_{cv}$ ), que corresponde al porcentaje de varianza explicada por la regresión para el colectivo de evaluación (*Figura 1.21*).

La mejor ecuación de regresión o modelo de calibración seleccionado por criterios estadísticos debe ser evaluado posteriormente con muestras desconocidas. A este hecho se le denomina predicción externa. Los estadísticos utilizados para evaluar la predicción externa son los siguientes:

- Error típico de predicción (SEP, *Standar Error of Prediction*): indica cómo se ajustan los datos de predicción al modelo construido con el conjunto de calibración. Su valor puede variar en función del error cometido en el laboratorio o de que las muestras seleccionadas para el colectivo de predicción estén bien representadas dentro del colectivo de calibración. Es el resultado de la siguiente ecuación (*Ecuación 1.6*):

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Ecuación 1.6}$$

donde  $y_i$  es el dato de referencia de la muestra  $i$  del colectivo de predicción utilizado para la predicción externa,  $\hat{y}_i$  es el valor estimado por el modelo de calibración, para la muestra  $i$  del grupo de predicción utilizado para predicción externa y  $N$  es el número de muestras del grupo de predicción utilizado para predicción externa.

- Coefficiente de determinación de predicción externa ( $R^2_p$ ): corresponde a la varianza explicada por la regresión (modelo de calibración) para el colectivo de predicción (*Ecuación 1.5*).

Otro estadístico de interés:

- Desviación predictiva residual (RPD, *Residual Predictive Deviation*): es la relación entre la SD de los datos de referencia y el SE (SEC, SECV o SEP) (*Ecuación 1.7*).

$$RPD = \frac{SD}{SEC/SECV/SEP} \quad \text{Ecuación 1.7}$$

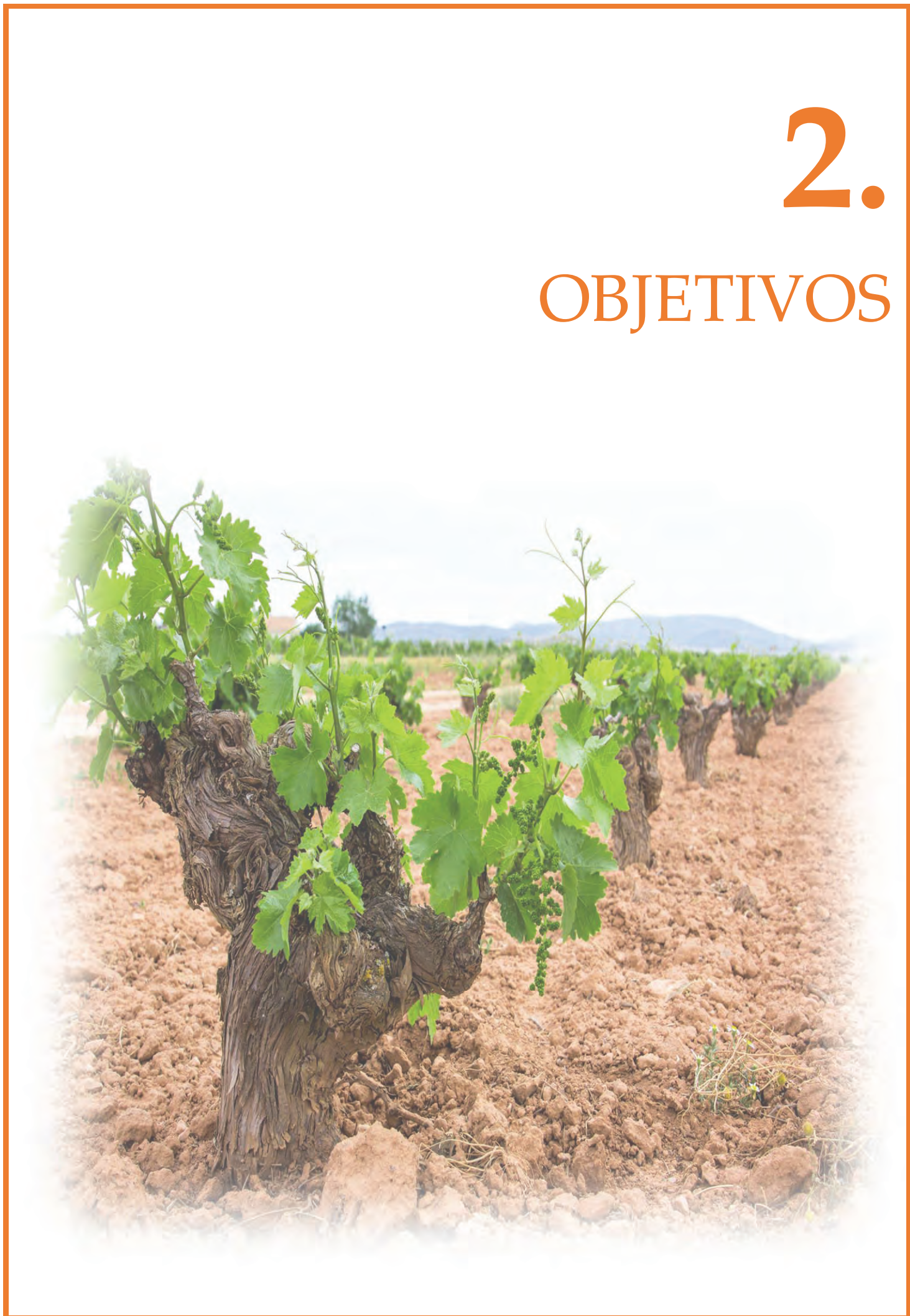
Por lo tanto, la eficiencia del modelo de calibración viene definida por el SECV y el SEP, por lo que, si estos errores son similares a la SD, o incluso superiores, significaría que la calibración no está estimando los valores de forma correcta. Por otro lado, para que la predicción se considere eficiente, el valor de RPD debe ser superior a 3 (Williams & Norris, 2001). Por lo general, en colectivos de calibración con  $N \geq 100$  muestras, y con colectivos de predicción con  $N \geq 9$ , los valores de SECV y SEP deben ser menores o iguales a 1,30 veces el valor de SEC para que se considere una buena predicción (Shenk & Westerhaus, 1996).





# 2.

## OBJETIVOS





El **objetivo principal** de la presente tesis doctoral fue obtener una herramienta que permita monitorizar la composición aromática de la uva, de forma rápida y no invasiva, a lo largo de su maduración.

Para poder desarrollar el objetivo principal, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- **Objetivo 1.** Optimizar los métodos de SBSE-GC-MS, <sup>m</sup>SBSE-GC-MS y TF-SPME-GC-MS con el fin de obtener las mejores condiciones de extracción para cuantificar la composición aromática de las bayas de uva.
- **Objetivo 2.** Construir modelos de calibración utilizando los datos espectrales y los datos cuantitativos obtenidos con el método de referencia optimizado, y evaluarlos mediante predicción externa en muestras desconocidas.
  - **Objetivo 2.1.** Adquirir espectros, en condiciones de laboratorio, mediante imagen hiperespectral (HSI) (VIS+SW-NIR) (400-1.000 nm) y espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) (1.100-2.100 nm), de bayas de *Vitis vinifera* L. Tempranillo y Tempranillo Blanco a lo largo de su maduración.
  - **Objetivo 2.2.** Cuantificar la composición aromática de esas mismas bayas en el laboratorio con el método optimizado para obtener los valores de referencia.





# 3.

## MATERIALES Y MÉTODOS





### 3.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO

#### 3.1.1. Materiales y equipos analíticos utilizados para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup>SBSE y la TF-SPME

En este apartado se presentan todos los materiales, reactivos, patrones y equipos utilizados para llevar a cabo la optimización de los métodos: extracción mediante barra agitadora absorbente (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*); su variante, extracción mediante múltiples barras agitadoras absorbentes (<sup>m</sup>SBSE, *multi - Stir Bar Sorptive Extraction*) y, por último, la novedosa técnica de microextracción en fase sólida mediante lámina de malla de carbono o película fina (TF-SPME, *Thin Film - Solid Phase Microextraction*).

##### 3.1.1.1. Materiales

Los materiales necesarios para poder llevar a cabo la optimización de los métodos fueron: agua Milli-Q® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), un Ultra-Turrax T-18 (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania), una estufa o incubadora de convección natural ICN 120 PLUS (ArgoLab, Carpi MO, Italia), un agitador magnético múltiple de 6 posiciones (LSCI, Rivesaltes, Francia) (*Figura 3.1*), y tubos Falcon de 50 mL (*Astik's*).



**Figura 3.1.** Incubadora con los agitadores de seis posiciones.

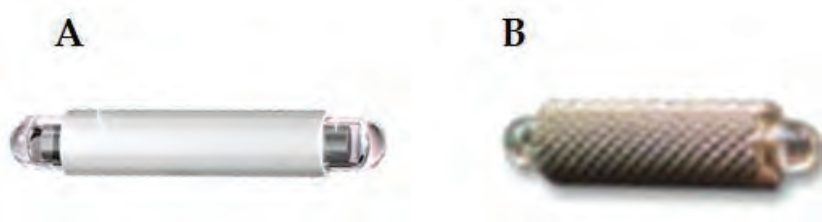
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Por otro lado, también fueron necesarios:

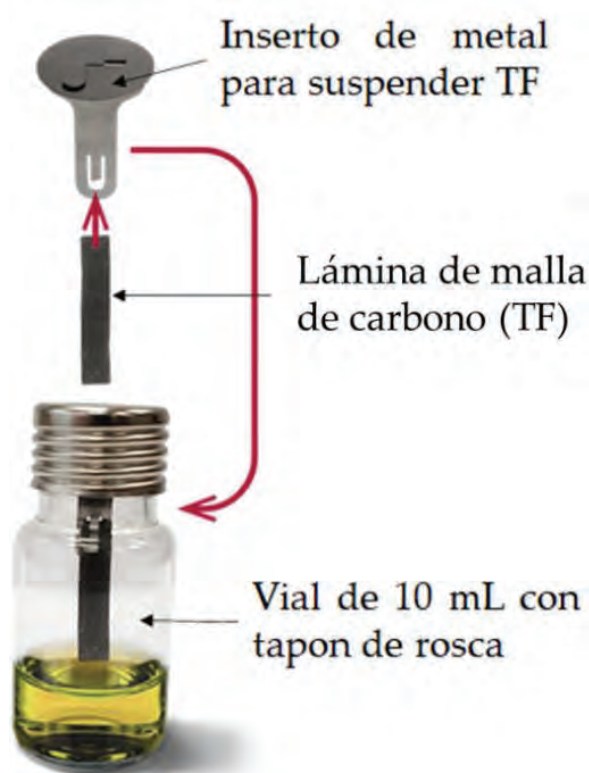
- Barritas agitadoras (*Twisters*) para SBSE de:
  - 10 mm de largo, recubiertas de 0,5 mm del material absorbente polidimetisiloxano (PDMS) (*Figura 3.2A*)
  - 10 mm de largo, recubiertas de 32  $\mu$ L de etilenglicol (EG) (*Figura 3.2B*)
- Tiras de malla de carbono o película fina (TF, *Thin Film*) de 0,45 mm de espesor, impregnadas de las fases absorbentes (*Figura 3.3*):
  - PDMS y carboxeno (PDMS/CAR)
  - PDMS y divinilbenceno (PDMS/DVB)
- Viales para espacio de cabeza (HS, *Head-Space*) de 20 mL
- Viales con rosca de vidrio transparente de 10 mL (*Figura 3.3*)
- Tapones con y sin rosca
- Insertos de vidrio para HS-SBSE
- Insertos de metal para suspender las TFs (*Figura 3.3*)
- *Liners* de vidrio rellenos con Tenax TA<sup>TM</sup>
- Agitadores magnéticos de vidrio de borosilicato

Todo ello obtenido de GERSTEL GmbH & Co (Mülheim an der Ruhr, Alemania).



**Figura 3.2.** *Twisters* de A) polidimetisiloxano (PDMS) y de B) etilenglicol (EG).





**Figura 3.3.** Lámina de malla de carbono o película fina (TF), vial roscado e inserto de metal TF.

#### 3.1.1.2. Reactivos

Los reactivos utilizados en la optimización del método fueron: cloruro de sodio (NaCl) y etanol (EtOH) (Merck, Darmstadt, Alemania).

#### 3.1.1.3. Patrones

Los estándares cromatográficos utilizados fueron suministrados por Merck y fueron los siguientes: linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -damascenona,  $\beta$ -ionona, 2-feniletanol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, acetato de 2-feniletilo, ácido hexanoico, ácido octanoico, 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico), 2-metil-1-butanol (alcohol amílico), 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-octanol (P.I. Patrón interno), 1-hexanol y hexanal.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1.1.4. Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS)

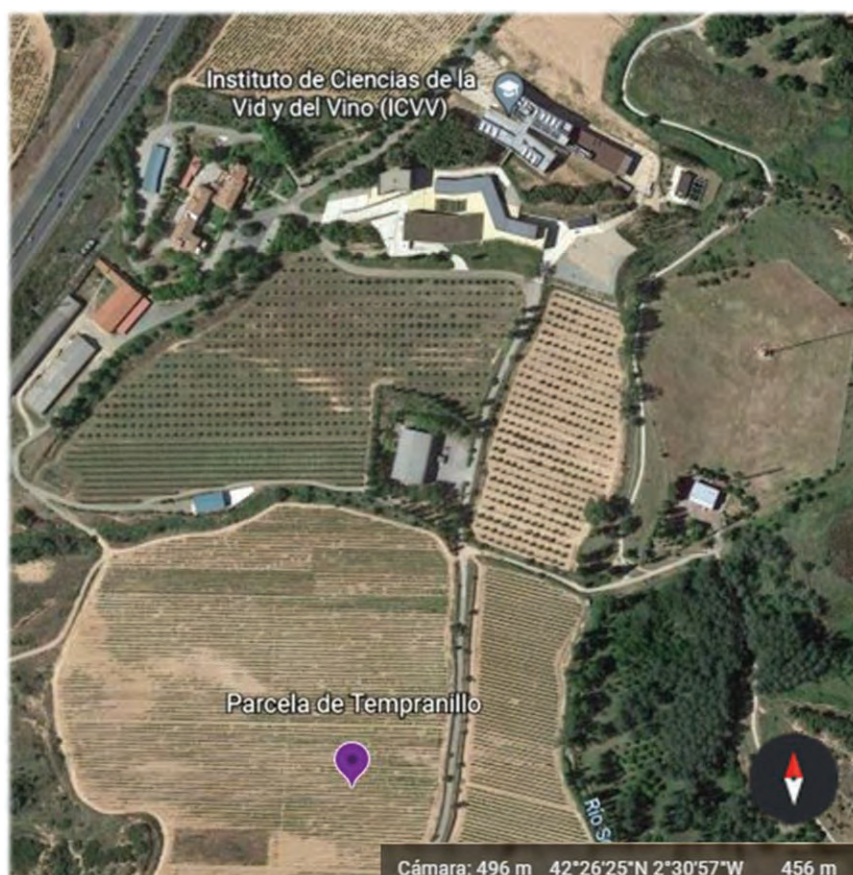
El equipo cromatográfico utilizado para la optimización de los métodos SBSE, <sup>m</sup>SBSE y TF-SPME es de la marca Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.). Consta de un cromatógrafo de gases (GC, *Gas Chromatograph*) 7890B, acoplado a un espectrómetro de masas (MS, *Mass Spectrometer*) de triple cuadrupolo (QqQ) 7000C. Este equipo está provisto de un automuestreador (GERSTEL) que consiste en un muestreador multipropósito (MPS, *MultiPurpose Sampler*) equipado con una bandeja de tubos de 98 posiciones, una unidad de desorción térmica (TDU, *Thermal Desorption Unit*) y un sistema de inyección refrigerado (CIS-4, *Cooled Injection System*) conectado a un *ranger* de N<sub>2</sub> (Carbueros Metálicos, Cornellà de Llobregat, España) (*Figura 3.4*). Se empleó una columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria BP21, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interior y 0,25 μm de espesor de película (SGE, Ringwood, Australia).



**Figura 3.4.** Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS).

### 3.1.2. Características y localización del área de muestreo para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup>SBSE y la TF-SPME

La parcela de Tempranillo (*Vitis vinifera* L.), de la que se recogió la uva necesaria para llevar a cabo la optimización de los métodos SBSE, <sup>m</sup>SBSE y TF-SPME, está situada en el Parque de La Grajera (Logroño, La Rioja, España), cerca del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, y pertenece al Gobierno de La Rioja (*Figura 3.5*). El viñedo se plantó en el año 1995 con el clon RJ-26 sobre el portainjerto 110-Richter con orientación Este-Oeste. Las coordenadas del viñedo son: latitud 42°26'25''N y longitud 2°30'57''O. La altitud de la parcela es de 456 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). La distancia entre hileras es de 2,8 m y la distancia entre cepas dentro de la misma hilera es de 1,2 m, siendo la densidad de plantación de 2.976 plantas/ha.

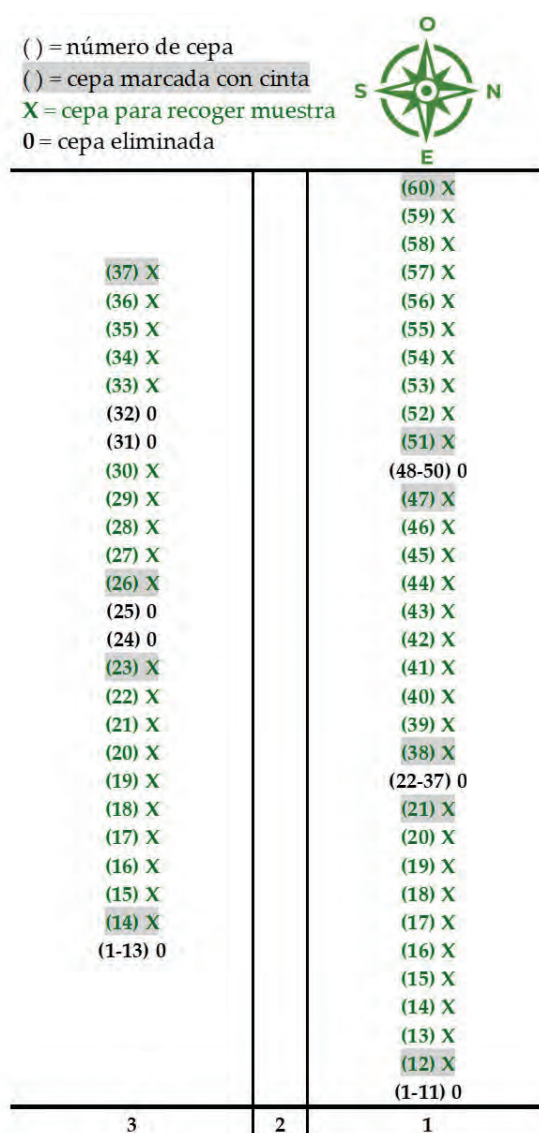


**Figura 3.5.** Parcela de Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.3. Toma de muestras para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup>SBSE y la TF-SPME

La toma de muestras para la optimización de los métodos de extracción se llevó a cabo en el año 2019. Para ello se escogieron 2 hileras de la parcela descrita anteriormente, y se marcaron un total de 50 cepas en bloques de 10, marcando la primera y la última cepa de cada bloque (*Figura 3.6*). El 3 de septiembre de 2019, cuando las uvas estaban en su momento óptimo de madurez tecnológica, se vendimiaron a mano, obteniendo un total de 44,4 Kg de uva.

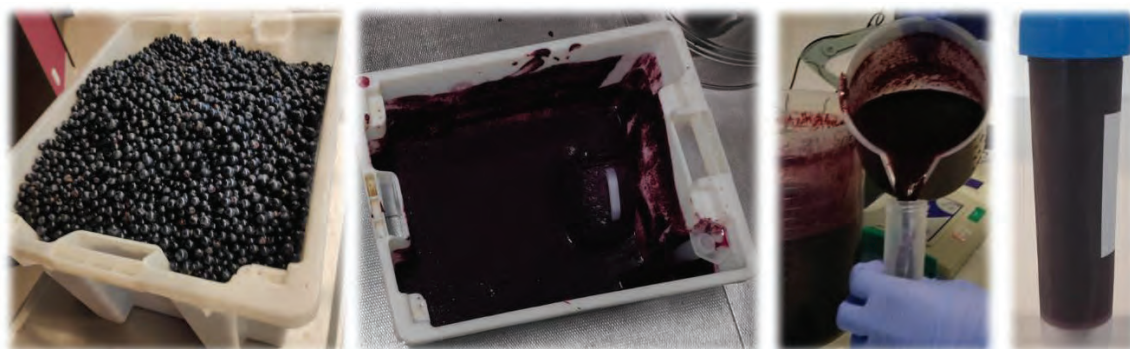


**Figura 3.6.** Cepas marcadas de la parcela de Tempranillo situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).



#### 3.1.4. Preparación de las muestras para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup>SBSE y la TF-SPME

Los racimos se desgranaron a mano en una caja y se mezclaron todas las bayas. Posteriormente se trituraron con el Ultra-Turrax hasta obtener una pasta homogénea. Con la pasta obtenida se llenaron un total de 450 tubos Falcon de 50 mL, que se congelaron a -20 °C hasta su posterior uso (*Figura 3.7*).



**Figura 3.7.** Proceso de preparación de la muestra para la optimización de los métodos analíticos SBSE, <sup>m</sup>SBSE y TF-SPME.

#### 3.1.5. Disolución patrón para la optimización de la SBSE, la <sup>m</sup>SBSE y la TF-SPME

Se preparó una disolución patrón en EtOH al 12 % en la que se añadieron todos los estándares. La concentración de los patrones fue: 0,001 mg/mL de linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -ionona, acetato de isoamilo, ácido hexanoico, ácido octanoico, isobutanol, hexanal, alcohol amílico, alcohol isoamílico y 1-hexanol; 0,0002 mg/mL de octanoato de etilo, hexanoato de etilo y decanoato de etilo; y  $9,99 \cdot 10^{-5}$  mg/mL de  $\beta$ -damascenona. Esta disolución se utilizó para determinar los tiempos de retención de cada compuesto y como adición estándar en las muestras de mosto, y así obtener una mejor señal cromatográfica, que facilitó la optimización de las técnicas de extracción.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1.6. Optimización del método de SBSE-GC-MS

En este apartado se van a definir todos los pasos seguidos para la optimización del método SBSE-GC-MS.

##### 3.1.6.1. Diseño de experimentos (DoE) para la SBSE

Se realizó un diseño factorial aleatorio mediante el *software* Minitab 18 (Minitab Inc, Pensilvania, EE. UU.). Tras una extensa búsqueda bibliográfica, los factores elegidos para realizar la optimización de la SBSE fueron: **la velocidad de agitación, el tiempo de extracción, la temperatura de extracción, la adición de NaCl y el modo de extracción**. Dentro de cada factor, y teniendo en cuenta la bibliografía, se escogieron tres condiciones o niveles a optimizar.

Para la velocidad de agitación, se probaron 500, 1.000 y 1.500 rpm, para el tiempo de extracción se probaron 1, 3 y 6 horas, como temperaturas de extracción se probaron 20, 40 y 60 °C, para la adición de NaCl, se probó añadir NaCl (Sí), no añadir NaCl (No) y añadir NaCl a la mitad del tiempo de extracción (secuencial), finalmente, para el modo de extracción se probó por HS, por inmersión directa (DI, *Direct Immersion*) y ambas a la vez con dos *Twisters*, uno por HS y otro por DI (HS+DI). Al hacer las pruebas iniciales se comprobó que se rompían los imanes y los *Twisters* a 1.500 rpm, por lo que se descartó este nivel y el factor velocidad de agitación se limitó a dos niveles o condiciones. Una vez establecidas las condiciones que se iban a optimizar para cada factor, se realizó un diseño factorial aleatorio de los 5 factores con 2, 3, 3, 3 y 3 niveles cada uno (*Tabla 3.1*). Se obtuvieron 162 combinaciones de condiciones distintas, cada combinación de condiciones se probó por duplicado, dando un total de 324 ensayos para SBSE.

**Tabla 3.1.** Factores y condiciones a optimizar para la técnica de SBSE.

FACTORES	NIVELES/CONDICIONES		
Velocidad de agitación (rpm)	500		1.000
Tiempo de extracción (h)	1	3	6
Temperatura de extracción (°C)	20	40	60
Adición de NaCl	Sí	No	Secuencial
Modo de extracción	HS-SBSE	SBSE	HS+DI

Secuencial: añadiendo NaCl a la mitad del tiempo de extracción; HS: espacio de cabeza; DI: inmersión directa.

### 3.1.6.2. Acondicionamiento y limpieza de los Twisters de PDMS

Los *Twisters* de PDMS se acondicionaron antes del primer uso y después de cada uso siguiendo las recomendaciones del proveedor (GERSTEL). Para ello, se colocaron en el tubo de desorción dentro de la bandeja de 98 posiciones y se desorbieron térmicamente en la TDU. La TDU se programó de 40 °C a 300 °C a una velocidad de 100 °C/min, y se mantuvo a 300 °C durante 45 minutos. La temperatura del CIS-4 fue de 300 °C durante 5 min, que se alcanzó a una velocidad de 12 °C/s. La temperatura del horno se programó a 40 °C y se mantuvo durante 5 min, después se calentó mediante dos rampas de temperatura, la primera fue de 2 °C/min hasta los 170 °C y la segunda fue a 10 °C/min hasta los 220 °C, donde se mantuvo durante 15 minutos. Las condiciones completas del método cromatográfico se recogen en la *Tabla 3.2*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 3.2.** Condiciones cromatográficas del método de acondicionamiento y limpieza para los *Twisters* de PDMS.

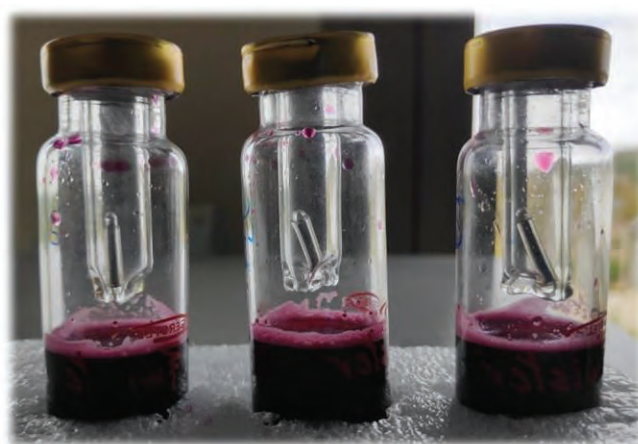
DESORCIÓN TÉRMICA		
TDU	T <sup>a</sup> Inicial	40 °C
	Rampa 1	
	Velocidad	100 °C/min
	Temperatura	300 °C
	Tiempo de espera	45 min
	Modo	<i>Splitless</i>
	T <sup>a</sup> de transferencia	Rampa de T <sup>a</sup>
CIS	<i>Liner</i>	Tenax TA™
	Inicial	
	T <sup>a</sup>	40 °C
	Tiempo de equilibrio	0,50 min
	Tiempo inicial	0,10 min
	Rampa	
	Velocidad	12 °C/min
	Temperatura	300 °C
Tiempo de espera	5 min	
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS		
COLUMNA BP21	Formato	Capilar
	Recubrimiento	Sílice fundida
	Dimensiones	
	Largo	30 m
	Diámetro interno	0,25 mm
	Espesor de película	0,25 µm
HORNO	T <sup>a</sup> inicial	40 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 1	
	Velocidad	2 °C/min
	Temperatura	170 °C
	Tiempo de espera	0 min
	Rampa 2	
	Velocidad	10 °C/min
	Temperatura	220 °C
	Tiempo de espera	15 min



#### 3.1.6.3. Extracción de compuestos volátiles por SBSE

Como se ha indicado en la *Tabla 3.1*, se probaron distintas combinaciones de condiciones con los cinco factores. Dependiendo del modo de extracción, se utilizó una cantidad de muestra u otra. En los ensayos que implicaban inmersión directa de los *Twisters* de PDMS en la muestra de mosto (DI o HS+DI), se diluyó la muestra al 10 % para que los azúcares naturalmente presentes en el mosto no estropearan los *Twisters*. Para llevar a cabo la extracción de compuestos volátiles de las muestras preparadas para la optimización (*Apartado 3.1.4*), se descongelaron los tubos Falcon necesarios y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 15 minutos. Una vez obtenido el mosto, se prepararon los viales de extracción.

Espacio de cabeza (HS-SBSE). En un vial de 20 mL para HS-SBSE, se añadió una alícuota de 8 mL del mosto centrifugado, 1 mL de la disolución patrón (*Apartado 3.1.5*), 25  $\mu$ L de 2-octanol (5  $\mu$ L de 2-octanol/100 mL de EtOH) y un agitador magnético de vidrio de borosilicato directamente en la muestra. En los ensayos que lo requerían, se añadieron 2,5 g de NaCl antes de comenzar la extracción o 2,5 g de NaCl a la mitad del tiempo de extracción (secuencial). Finalmente, se colocó el *Twister* de PDMS en el inserto de vidrio para HS (*Figura 3.8*), para que el *Twister* no tocara la muestra, y se introdujo el inserto con el *Twister* en el vial de 20 mL.



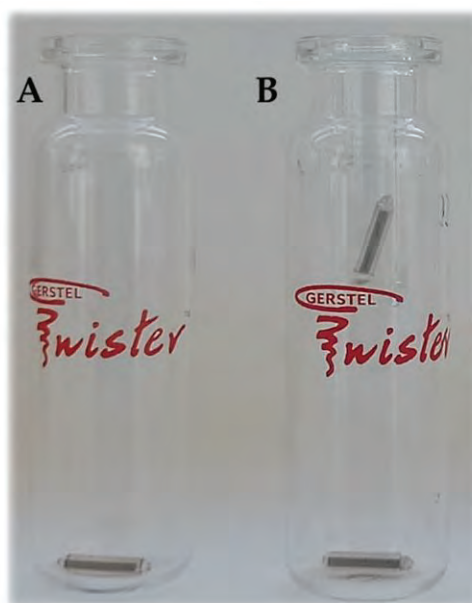
**Figura 3.8.** Viales de 20 mL para HS-SBSE con un *Twister* de PDMS dentro del inserto de vidrio para espacio de cabeza.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Inmersión directa (DI), y/o espacio de cabeza + inmersión directa (HS+DI). En un vial de 20 mL para HS-SBSE, se añadió una alícuota de 0,8 mL del mosto centrifugado, 0,1 mL de la disolución patrón (*Apartado 3.1.5*), 25  $\mu$ L de 2-octanol (5  $\mu$ L de 2-octanol/100 mL de EtOH) y 8,1 mL de agua Milli-Q®. En los ensayos que lo requerían, se añadieron 2,5 g de NaCl antes de comenzar la extracción o 2,5 g de NaCl a la mitad del tiempo de extracción (secuencial). Los compuestos se extrajeron añadiendo el *Twister* de PDMS directamente en la muestra (DI) o un *Twister* en el inserto de vidrio para HS y otro en la muestra (HS+DI). En estos casos, el propio *Twister* sirvió de agitador magnético (*Figura 3.9*).

Una vez preparados los viales, las muestras fueron agitadas a 500 o 1.000 rpm, durante 1, 3 o 6 horas, a 20, 40 o 60 °C. Al final del tiempo de extracción, el *Twister* se sacó de la muestra con unas pinzas magnéticas, se limpió con agua Milli-Q® y se secó con un papel. Una vez seco, se transfirió a los tubos de desorción térmica, que se colocaron en la bandeja del automuestreador, para su posterior desorción y análisis en el GC-MS.



**Figura 3.9.** Viales de 20 mL con A) el *Twister* de PDMS por inmersión y B) un *Twister* de PDMS por inmersión y otro por espacio de cabeza.

## 3.1.6.4. Condiciones de desorción para la SBSE-GC-MS

El método cromatográfico utilizado para la determinación de la composición volátil del mosto se basa en el descrito por (Sánchez-Gómez et al., 2014) con algunas modificaciones. Los compuestos volátiles absorbidos en los *Twisters* de PDMS fueron desorbidos en la TDU usando helio como gas portador a un flujo de 75 mL/min, a una presión constante de 20,75 psi. La TDU se programó de 40 °C a 295 °C con una rampa de temperatura de 60 °C/min, y se mantuvo a 295 °C durante 5 min. La TDU operó en el modo *splitless*. Una vez desorbidos, los analitos se retuvieron en el CIS-4, que contenía un *liner* de Tenax TA™, mediante enfriamiento con N<sub>2</sub> líquido a -40 °C. Tras la retención de los analitos en el CIS-4, este se programó a 12 °C/s para alcanzar la temperatura de 260 °C durante 5 minutos, y así transferir los analitos a la columna cromatográfica. Las condiciones de desorción se pueden ver en la *Tabla 3.3*.

**Tabla 3.3.** Condiciones de desorción del método cromatográfico utilizado para la SBSE.

DESORCIÓN TÉRMICA		
TDU	T <sup>a</sup> Inicial	40 °C
	Presión	20,75 psi
	Rampa	
	Velocidad	60 °C/min
	Temperatura	295 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Modo	<i>Splitless</i>
	T <sup>a</sup> de transferencia	Rampa de T <sup>a</sup>
CIS	<i>Liner</i>	Tenax TA™
	Inicial	
	T <sup>a</sup>	-40 °C
	Tiempo de equilibrio	0,50 min
	Tiempo inicial	0,10 min
	Rampa	
	Velocidad	12 °C/min
	Temperatura	260 °C
Tiempo de espera	5 min	

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1.6.5. Condiciones cromatográficas para la SBSE-GC-MS

Los compuestos volátiles desorbidos se separaron en el GC y se detectaron en el MS (QqQ), operando en cuadrupolo simple (Q). La temperatura del horno del GC se programó de los 40 °C a los 230 °C mediante cuatro rampas de temperatura. La temperatura inicial (40 °C) se mantuvo durante 2 min y se elevó mediante una primera rampa de 5 °C/min hasta los 80 °C, donde se mantuvo otros 2 minutos, después se realizó una segunda rampa de 10 °C/min hasta los 130 °C, donde se mantuvo por 2 minutos, la tercera rampa fue de 5 °C/min hasta los 150 °C, donde se mantuvo 5 minutos, y finalmente, la cuarta rampa subió a 10 °C/min hasta los 230 °C, que fueron mantenidos durante otros 5 minutos. La adquisición en el detector (MS) se realizó en *Full Scan*, o barrido completo de todos los iones comprendidos entre 35 y 300 *m/z*, con una energía de ionización de 70 eV. Los compuestos se identificaron utilizando el tiempo de retención obtenido para cada compuesto tras analizar la disolución patrón, y también comparando el espectro de masas obtenido con los de la librería NIST. La integración se realizó en el cromatograma de iones extraídos (EIC, *Extracted Ion Chromatogram*), extrayendo el ion principal de cada compuesto. Los iones extraídos para la integración de cada compuesto aparecen en la *Tabla 3.4*. La cantidad de los compuestos volátiles del mosto se expresó como área relativa. Las condiciones del GC y del MS se pueden ver en la *Tabla 3.5*.

**Tabla 3.4.** Lista de compuestos volátiles identificados en los cromatogramas obtenidos con el método SBSE-GC-MS y valores de  $m/z$  utilizados para su integración.

<b>Compuesto</b>	<b><math>m/z</math></b>	<b>Compuesto</b>	<b><math>m/z</math></b>
(E)-2-hexenal	<b>41</b>	$\beta$ -Damascenona Geraniol	<b>69</b>
Acetato de isoamilo Acetol Decanal	<b>43</b>	Linalool	<b>71</b>
<b>2-Octanol (P.I.)</b>	<b>45</b>	Benzaldehído	<b>77</b>
Alcohol isoamílico	<b>55</b>	Jasmonato de metilo	<b>83</b>
Hexanal 1-Hexanol	<b>56</b>	Hexanoato de etilo Octanoato de etilo Decanoato de etilo	<b>88</b>
Alcohol amílico (E)-2-Hexen-1-ol 2-Etil-1-hexanol	<b>57</b>	2-Feniletanol	<b>91</b>
$\alpha$ -Terpineol	<b>59</b>	Furanmetanol	<b>98</b>
Ácido hexanoico Ácido octanoico	<b>60</b>	$\beta$ -Ionona	<b>177</b>
(Z)-3-Hexen-1-ol	<b>67</b>		

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 3.5.** Condiciones cromatográficas del método analítico utilizado para el análisis e identificación de compuestos volátiles en mosto extraídos por SBSE, <sup>m</sup>SBSE y TF-SPME.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS		
<b>COLUMNA</b> BP21	Formato	Capilar
	Recubrimiento	Sílice fundida
	Dimensiones	
	Largo	30 m
	Diámetro interno	0,25 mm
	Espesor de película	0,25 µm
<b>HORNO</b>	Tª inicial	40 °C
	Tiempo de espera	2 min
	Rampa 1	
	Velocidad	5 °C/min
	Temperatura	80 °C
	Tiempo de espera	2 min
	Rampa 2	
	Velocidad	10 °C/min
	Temperatura	130 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 3	
	Velocidad	5 °C/min
	Temperatura	150 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 4	
Velocidad	10 °C/min	
Temperatura	230 °C	
Tiempo de espera	5 min	
<b>MS</b>		
	Modo <i>Full Scan</i>	35 -300 m/z
	Energía ionización	70 eV
	Tª línea transferencia	230 °C

### 3.1.7. Optimización del método de <sup>m</sup>SBSE-GC-MS

En este apartado se van a definir todos los pasos seguidos para la optimización del método <sup>m</sup>SBSE-GC-MS.

#### 3.1.7.1. Diseño de experimentos (DoE) para la <sup>m</sup>SBSE

Como los *Twisters* y los imanes se rompían a 1.500 rpm, se descartó esa condición y se realizó un diseño factorial aleatorio de 4 factores con 2, 3, 3 y 2 niveles/condiciones cada uno (*Tabla 3.6*). Los factores elegidos para optimizar en esta variante de SBSE fueron la velocidad de agitación, a 500 y 1.000 rpm, el tiempo de extracción, durante 1, 3 y 6 horas, la temperatura de extracción, a 20, 40 y 60 °C, y la adición de NaCl, añadiendo (Sí) y sin añadir (No) (*Tabla 3.6*).

**Tabla 3.6.** Factores y condiciones a optimizar para la técnica de <sup>m</sup>SBSE.

FACTORES	NIVELES/CONDICIONES		
<b>Velocidad de agitación (rpm)</b>	500		1.000
<b>Tiempo de extracción (h)</b>	1	3	6
<b>Temperatura de extracción (°C)</b>	20	40	60
<b>Adición de NaCl</b>	Sí		No

En este caso no se optimizó el factor “modo de extracción”, ya que el *Twister* de PDMS se colocaba siempre por DI y el de EG se colocaba siempre por HS, debido a que este es más frágil que el de PDMS y podría romperse con la agitación. Tampoco se ha probado la adición de NaCl de forma secuencial, puesto que el objetivo principal de añadir NaCl a mitad del tiempo de extracción era favorecer la extracción de los compuestos menos polares antes de añadir la sal, y de los más polares después de añadirla, y este hecho ya se produce de forma automática al utilizar *Twisters* de PDMS (favorece la extracción de los compuestos menos polares) y de EG (favorece la extracción de los compuestos más polares) simultáneamente. Se obtuvieron 36 combinaciones de condiciones distintas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Cada combinación de condiciones se probó por duplicado, dando un total de 72 ensayos para la técnica de <sup>m</sup>SBSE.

#### 3.1.7.2. Acondicionamiento y limpieza de los *Twisters* de EG

El método de acondicionamiento de los *Twisters* de PDMS se ha descrito en el *Apartado 3.1.3.2* y en la *Tabla 3.2*. Los *Twisters* de EG también se acondicionaron antes del primer uso y después de cada uso siguiendo las recomendaciones de GERSTEL. Se desorbieron térmicamente en la TDU, el programa de temperatura de la TDU se diseñó siguiendo las recomendaciones del proveedor para este tipo de *Twister*. La TDU comenzó a 40 °C y subió a una velocidad de 100 °C/min hasta los 240 °C, donde se mantuvo durante 30 minutos. El CIS-4 se programó para alcanzar los 240 °C a una velocidad de 12 °C/s y se mantuvo a esa temperatura durante 5 min. La temperatura del horno del cromatógrafo se programó a 40 °C, y se mantuvo durante 5 min, después se calentó mediante dos rampas de temperatura, la primera fue de 2 °C/min hasta los 170 °C y la segunda fue a 10 °C/min hasta los 220 °C, donde se mantuvo durante 15 minutos. Las condiciones completas se pueden observar en la *Tabla 3.7*.



**Tabla 3.7.** Condiciones cromatográficas del método de acondicionamiento y limpieza para los *Twisters* de EG.

<b>DESORCIÓN TÉRMICA</b>		
<b>TDU</b>	T <sup>a</sup> Inicial	40 °C
	Rampa	
	Velocidad	100 °C/min
	Temperatura	240 °C
	Tiempo de espera	30 min
	Modo	<i>Splitless</i>
	T <sup>a</sup> de transferencia	Rampa de T <sup>a</sup>
<b>CIS</b>	<i>Liner</i>	Tenax TA™
	Inicial	
	T <sup>a</sup>	40 °C
	Tiempo de equilibrio	0,50 min
	Tiempo inicial	0,10 min
	Rampa	
	Velocidad	12 °C/min
	Temperatura	240 °C
	Tiempo de espera	5 min
<b>CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</b>		
<b>COLUMNA BP21</b>	Formato	Capilar
	Recubrimiento	Sílice fundida
	Dimensiones	
	Largo	30 m
	Diámetro interno	0,25 mm
	Espesor de película	0,25 µm
<b>HORNO</b>	T <sup>a</sup> inicial	40 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 1	
	Velocidad	2 °C/min
	Temperatura	170 °C
	Tiempo de espera	0 min
	Rampa 2	
	Velocidad	10 °C/min
	Temperatura	220 °C
Tiempo de espera	15 min	

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1.7.3. Extracción de compuestos volátiles por <sup>m</sup>SBSE

Para la extracción de compuestos volátiles mediante <sup>m</sup>SBSE se descongelaron los Falcon necesarios (*Apartado 3.1.4*) y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 15 minutos. Una vez obtenido el mosto, se prepararon los viales de extracción. Para ello, en un vial de 20 mL para HS-SBSE, se añadió 0,8 mL de mosto centrifugado, 0,1 mL de disolución patrón (*Apartado 3.1.5*), 25  $\mu$ L de 2-octanol (5  $\mu$ L de 2-octanol/100 mL de EtOH), 8,1 mL de agua Milli-Q®, y, cuando se requería la adición de sal, 2,5 g de NaCl. Los compuestos se extrajeron introduciendo el *Twister* de PDMS directamente en la muestra de mosto, actuando además como agitador, y el *Twister* de EG en el inserto de vidrio para HS (*Figura 3.10*).

Finalmente, cada vial se agitó a la velocidad, tiempo y temperatura que le correspondía, es decir a 500 o 1.000 rpm, durante 1, 3 o 6 horas, a 20, 40 o 60 °C. Una vez finalizada la extracción, se retiraron los *Twisters* (PDMS y EG) con unas pinzas magnéticas, se limpiaron con agua Milli-Q® y se secaron con un papel. Posteriormente se introdujeron ambos en el mismo tubo de desorción, para llevar a cabo una desorción simultánea en la TDU, seguida de su análisis en el GC-MS.



**Figura 3.10.** Vial de 20 mL con un *Twister* de PDMS por inmersión y otro de EG por espacio de cabeza.

3.1.7.4. Condiciones de desorción para la <sup>m</sup>SBSE-GC-MS

El método cromatográfico utilizado para la determinación de la composición volátil del mosto se basa en el descrito en el *Apartado 3.1.6.4*, con algunas modificaciones realizadas, siguiendo las recomendaciones del proveedor, para los *Twisters* de EG. Los volátiles absorbidos en los *Twisters* de PDMS y de EG fueron desorbidos en la TDU, usando helio como gas portador a un flujo de 50 mL/min y a una presión constante de 20,75 psi. La TDU se programó de 40 °C a 200 °C con una rampa de temperatura de 60 °C/min, y se mantuvo a 200 °C durante 5 min. La TDU operó en el modo *splitless*. Los analitos fueron transferidos al CIS-4 a través de un *liner* de Tenax TA™ y retenidos mediante enfriamiento con N<sub>2</sub> líquido a -40 °C. Posteriormente el CIS-4 fue programado para subir de -40 °C a una velocidad de 12 °C/s hasta los 230 °C, y se mantuvo a esta temperatura durante 5 minutos, para que todos los analitos pasasen a la columna cromatográfica. Las condiciones de desorción se pueden ver en la *Tabla 3.8*.

**Tabla 3.8.** Condiciones de desorción del método cromatográfico para la <sup>m</sup>SBSE.

DESORCIÓN TÉRMICA		
TDU	T <sup>a</sup> Inicial	40 °C
	Presión	20,75 psi
	Rampa	
	Velocidad	60 °C/min
	Temperatura	200 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Modo	<i>Splitless</i>
	T <sup>a</sup> de transferencia	Rampa de T <sup>a</sup>
	<i>Liner</i>	Tenax TA™
CIS	Inicial	
	T <sup>a</sup>	-40 °C
	Tiempo de equilibrio	0,50 min
	Tiempo inicial	0,10 min
	Rampa	
	Velocidad	12 °C/min
	Temperatura	230 °C
Tiempo de espera	5 min	

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1.7.5. Condiciones cromatográficas para la <sup>m</sup>SBSE-GC-MS

Las condiciones cromatográficas y de adquisición fueron las mismas que para SBSE (*Apartado 3.1.6.5*) y se pueden ver en la *Tabla 3.5*. Los iones principales con los que se ha integrado cada compuesto se muestran en la *Tabla 3.4*.

#### 3.1.8. Optimización del método de TF-SPME-GC-MS

A lo largo de los siguientes apartados se van a definir todos los pasos que se llevaron a cabo para la optimización del método TF-SPME-GC-MS.

##### 3.1.8.1. Diseño de experimentos (DoE) para la TF-SPME

Se realizó un diseño factorial aleatorio de 4 factores con 2, 3, 3 y 2 niveles/condiciones (*Tabla 3.9*). Tras leer la escasa bibliografía que existe sobre la técnica se decidieron optimizar los siguientes factores (condiciones): velocidad de agitación (500 y 1.000 rpm), tiempo de extracción (1, 3 y 6 horas), temperatura de extracción (20, 40 y 60 °C) y modo de extracción (HS y DI). Se obtuvieron 36 combinaciones de condiciones distintas. Cada combinación de condiciones se realizó por duplicado, dando un total de 72 ensayos. Además, se probaron dos tipos de TF, formadas por dos fases distintas, una compuesta de la mezcla PDMS/CAR y otra de la mezcla PDMS/DVB, por lo que se realizaron 72 pruebas con cada tipo de fase (*Tabla 3.9*).

En este caso no se optimizó la adición de NaCl debido a que la TF está recubierta de una fase (PDMS/CAR o PDMS/DVB) que, en principio, permite la extracción de compuestos volátiles en un gran rango de polaridades, y, en los artículos existentes sobre TF-SPME, para la extracción de compuestos volátiles en bebidas acuosas y/o comida, no utilizan NaCl (Stuff et al., 2018; Vernarelli et al., 2019).

**Tabla 3.9.** Factores y condiciones a optimizar para la técnica de TF-SPME, para cada tipo de fase (PDMS/CAR y PDMS/DVB).

FACTORES	NIVELES/CONDICIONES		
Velocidad de agitación (rpm)	500		1.000
Tiempo de extracción (h)	1	3	6
Temperatura de extracción (°C)	20	40	60
Modo de extracción	HS		DI

HS: espacio de cabeza; DI: inmersión directa.

### 3.1.8.2. Acondicionamiento y limpieza de las TFs

Las tiras de malla de carbono o película fina (TFs) de PDMS/CAR y de PDMS/DVB se acondicionaron antes del primer uso y después de cada uso, siguiendo las recomendaciones del proveedor (GERSTEL). Las TFs se colocaron en los tubos de desorción situados en la bandeja de 98 posiciones del automuestreador acoplado al GC-MS. El flujo de helio fue de 100 mL/min, a una presión constante de 20,75 psi. El programa de temperatura de la TDU se configuró de 40 °C a 250 °C, mediante una rampa de temperatura de 100 °C/min, y se mantuvo a 250 °C durante 50 minutos. El CIS-4 se programó inicialmente a 40 °C, y subió hasta los 250 °C, mediante una rampa de temperatura de 12 °C/s, y se mantuvo durante 5 minutos. La temperatura del horno se programó a 40 °C, y se mantuvo durante 2 min, después se calentó mediante dos rampas de temperatura de 10 °C/min, en la primera subió hasta los 150 °C, y se mantuvo durante 5 min, en la segunda subió hasta los 220 °C, y se mantuvo 2 minutos. Las condiciones completas del método de acondicionamiento y limpieza se pueden observar en la *Tabla 3.10*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 3.10.** Condiciones cromatográficas del método de acondicionamiento para las TFs de PDMS/CAR y las de PDMS/DVB.

<b>DESORCIÓN TÉRMICA</b>		
<b>TDU</b>	T <sup>a</sup> Inicial	40 °C
	Presión	20,75 psi
	Rampa	
	Velocidad	100 °C/min
	Temperatura	250 °C
	Tiempo de espera	50 min
	Modo	<i>Splitless</i>
	T <sup>a</sup> de transferencia	Rampa de T <sup>a</sup>
<b>CIS</b>	<i>Liner</i>	Tenax TA™
	Inicial	
	T <sup>a</sup>	40 °C
	Tiempo de equilibrio	0,50 min
	Tiempo inicial	0,10 min
	Rampa	
	Velocidad	12 °C/s
	Temperatura	250 °C
Tiempo de espera	5 min	
<b>CONDICIONES CROMATÓGRAFO</b>		
<b>COLUMNA BP21</b>	Formato	Capilar
	Recubrimiento	Sílice fundida
	Dimensiones	
	Largo	30 m
	Diámetro interno	0,25 mm
	Espesor de película	0,25 µm
<b>HORNO</b>	T <sup>a</sup> inicial	40 °C
	Tiempo de espera	2 min
	Rampa 1	
	Velocidad	10 °C/min
	Temperatura	150 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 2	
	Velocidad	10 °C/min
Temperatura	230 °C	
Tiempo de espera	2 min	

#### 3.1.8.3. Extracción de compuestos volátiles por TF-SPME

Para llevar a cabo la extracción de compuestos volátiles de las muestras preparadas para la optimización (*Apartado 3.1.4*), se descongelaron los tubos Falcon necesarios y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 15 minutos. Una vez obtenido el mosto, se llevó a cabo la preparación de los viales de extracción. Para ello, en un vial de 10 mL con rosca (cuando se trabajaba por DI) o en un vial de 20 mL (cuando se trabajaba por HS), se añadieron 8 mL de muestra de mosto centrifugado, 1 mL de la disolución patrón (*Apartado 3.1.5*), y 25  $\mu$ L del patrón interno 2-octanol (5  $\mu$ L de 2-octanol/100 mL de EtOH). Se añadió un agitador magnético de vidrio de borosilicato y se suspendió la lámina de malla de carbono (PDMS/CAR o PDMS/DVB) con el inserto de metal para TF.

Se prepararon un total de 72 viales para cada tipo de absorbente, y cada uno de ellos se agitó a 500 o 1.000 rpm, durante el 1, 3 o 6 horas, y a 20, 40 o 60 °C. Transcurrido el tiempo de extracción, se retiró la TF con unas pinzas, se limpió con agua Milli-Q® y se secó con un papel. Una vez seca, se colocó en un tubo de desorción con un tapón de lana de vidrio en la base (para que la TF no pase a la TDU), situado en la bandeja de tubos de 98 posiciones del automuestreador, para su posterior análisis en el GC-MS. En la *Figura 3.11* se puede observar en detalle la extracción de compuestos volátiles mediante TF-SPME.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 3.11.** Esquema del proceso de extracción de compuestos volátiles mediante TF-SPME. A) TF en el inserto de metal, B) TFs colocadas en los viales de 10 mL (inmersión) y de 20 mL (espacio de cabeza), C) muestras colocadas en el agitador de 6 posiciones realizando la extracción, D) TF colocada dentro del tubo de desorción, E) tubo de desorción dentro de la bandeja de 98 posiciones del automuestreador y F) tubo de desorción dentro de la TDU.

#### 3.1.8.4. Condiciones de desorción para la TF-SPME-GC-MS

El método utilizado para la determinación de la composición volátil del mosto se basa en el descrito en el *Apartado 3.1.6.4* para SBSE, pero con las modificaciones necesarias para TF-SPME. La desorción de los compuestos volátiles absorbidos en las TFs se realizó en la TDU usando helio como gas portador a un flujo de 60 mL/min y a una presión constante de 20,75 psi. La TDU se programó de 40 °C a 250 °C mediante una rampa de temperatura de 60 °C/min, y se mantuvo a 250 °C durante 5 min. Los analitos se retuvieron en el CIS-4, que contenía el *liner* de Tenax TA™, a -40 °C con refrigeración mediante N<sub>2</sub> líquido. Tras la desorción y



la concentración de los analitos en el CIS-4, este se calentó de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $12\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ , y se mantuvo a esa temperatura durante 5 minutos para terminar de transferir los analitos a la columna cromatográfica. Las condiciones de la desorción se pueden observar en la *Tabla 3.11*.

**Tabla 3.11.** Condiciones de desorción del método cromatográfico para la TF-SPME.

DESORCIÓN TÉRMICA		
TDU	T <sup>a</sup> Inicial	40 °C
	Presión	20,75 psi
	Rampa 1	
	Velocidad	60 °C/min
	Temperatura	250 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Modo	<i>Splitless</i>
	T <sup>a</sup> de transferencia	Rampa de T <sup>a</sup>
CIS	<i>Liner</i>	Tenax TA™
	Inicial	
	T <sup>a</sup>	$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Tiempo de equilibrio	0,50 min
	Tiempo inicial	0,10 min
	Rampa	
	Velocidad	$12\text{ }^{\circ}\text{C/s}$
	Temperatura	$230\text{ }^{\circ}\text{C}$
Tiempo de espera	5 min	

#### 3.1.8.5. Condiciones cromatográficas para la TF-SPME-GC-MS

Las condiciones cromatográficas y de adquisición son las mismas que para SBSE y <sup>m</sup>SBSE (*Apartado 3.1.6.5*) y se pueden ver resumidas en la *Tabla 3.5*. La identificación de compuestos también se realizó de la misma manera que para SBSE y <sup>m</sup>SBSE. Los iones principales utilizados para integrar cada compuesto volátil obtenido por TF-SPME-GC-MS son los que aparecen en la *Tabla 3.4*, añadiendo en este caso el heptanal ( $m/z = 70$ ).

#### 3.1.9. Análisis estadístico

Con el objetivo de encontrar la combinación de condiciones que maximice la extracción global de compuestos volátiles del mosto, se propuso un análisis estadístico en el que se estudiaron, simultáneamente, los valores de área relativa de todos los compuestos volátiles, obtenidos en cada una de las combinaciones de condiciones descritas experimentalmente.

Antes de abordar este análisis, se realizó un exhaustivo análisis descriptivo de los resultados obtenidos, que permitió eliminar, cuando fue necesario, algún compuesto y/o cromatograma (*outliers*). Al realizar el análisis descriptivo se observó que existía un considerable grado de relación entre las condiciones que mejor extraían algunos de los compuestos volátiles, lo que justificó la necesidad de analizar todos los valores de forma conjunta mediante un tratamiento multivariante.

Para realizar el análisis conjunto de los compuestos volátiles, en primer lugar se realizó un análisis de componentes principales (PCA), que permitió reducir, en gran medida, la dimensionalidad del problema, sintetizando los vectores de datos iniciales, en un número reducido de componentes principales (G. James et al., 2013). Con el fin de simplificar la interpretación de cada componente principal, se aplicó el método de rotación *Varimax* (Kaiser, 1958). También se realizó la prueba de adecuación muestral de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de esfericidad de Barlett, para comprobar que es adecuado realizar un análisis factorial con los datos obtenidos (Hair et al., 2010). En segundo lugar, se realizó un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA, *Analysis of Variance*), tomando como variable respuesta los *scores* de cada una de las componentes principales (PCs). La selección de las condiciones óptimas se realizó teniendo en cuenta las condiciones que producían los valores más elevados en cada una de

las componentes principales (PCs), y buscando entre ellas una solución de equilibrio, con el fin de encontrar la maximización global.

Este análisis estadístico se realizó de forma individual para cada método, con el objetivo de obtener las mejores condiciones de extracción para SBSE, las mejores para <sup>m</sup>SBSE y las mejores para TF-SPME. Se utilizó el *software* IBM SPSS Statistics para Windows, versión 25.0. (IBM Corp, Armonk, EE.UU.).

Finalmente, para elegir el método con el que se iban a analizar las muestras que formarían los modelos de calibración, se llevaron a cabo 3 extracciones en mosto con la mejor combinación de condiciones obtenida para la SBSE, y otras tres con las mejores condiciones obtenidas para la <sup>m</sup>SBSE, y se compararon mediante un ANOVA de un factor. La técnica que mejores resultados proporcionó fue la SBSE, que se comparó con las mejores condiciones obtenidas para TF-SPME siguiendo la misma dinámica (*Apartado 4.2*). La comparación dio como resultado que la técnica TF-SPME era la que más maximizaba la extracción de compuestos volátiles del mosto, por lo que fue la técnica utilizada para obtener los datos de referencia que se emplearán en la construcción de los modelos de calibración.

## 3.2. USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO

### 3.2.1. Materiales, sensores y equipo analítico

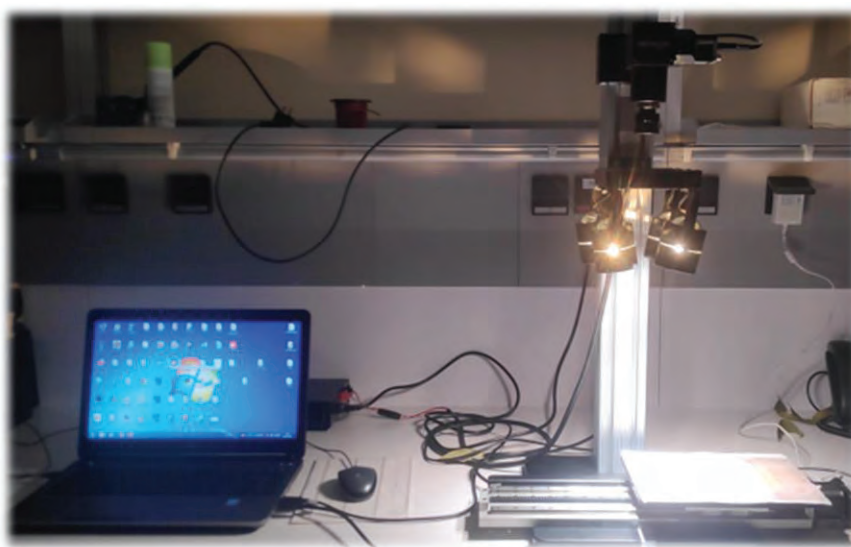
En este apartado se presentan todos los materiales, sensores y equipo analítico utilizados para llevar a cabo la toma de datos espectrales mediante imagen hiperespectral y espectroscopía NIR, la medida del °Brix mediante refractometría y el análisis de compuestos volátiles mediante el método de referencia TF-SPME-GC-MS.

#### 3.2.1.1. *Materiales*

Los materiales necesarios para poder llevar a cabo las medidas espectrales, la medida de °Brix y el análisis de compuestos volátiles en las muestras de Tempranillo y Tempranillo Blanco fueron: batidora Philips HR2602/00 (Philips, Ámsterdam, Holanda), tubos Falcon de 50 mL (Astik's), los reactivos NaCl, EtOH y 2-octanol (Merck), agua Milli-Q®, agitador magnético múltiple de 6 posiciones (LSCI), TF impregnadas de la fase absorbente PDMS/CAR (GERSTEL), viales con rosca de vidrio transparente de 10 mL, sus tapones e insertos de metal para suspender las TFs (*Figura 3.3*) (GERSTEL), *liners* de vidrio rellenos con Tenax TA™ (GERSTEL) y agitadores magnéticos de vidrio de borosilicato (GERSTEL).

### 3.2.1.2. Cámara hiperespectral

El sistema se componía de: la cámara hiperespectral utilizada para realizar la medida de los espectros, en el rango visible + infrarrojo cercano de onda corta (VIS+SW-NIR) (400-1.000 nm), que fue una Resonon Pika L VIS-NIR (Resonon Inc, Bozeman, EE.UU.) (Figura 3.12), una fuente de iluminación con 4 lámparas halógenas de 50 W, una plataforma móvil, en la que se colocaba la muestra y un ordenador en el que estaba instalado el *software* de análisis.



**Figura 3.12.** Cámara de imagen hiperespectral Resonon Pika L VIS-NIR.

Como referencia blanca se utilizó un Spectralon™ (Labsphere, Sutton, EE.UU.) (Figura 3.13A), como referencia oscura se utilizó el tapón del objetivo de la cámara (Figura 3.13B) y para colocar las bayas de uva se utilizaron dos porta muestras (Figura 3.13C).



**Figura 3.13.** Partes de la cámara de imagen hiperespectral. A) Spectralon™, B) tapón para el objetivo, C) porta muestras.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.2.1.3. Espectrómetro de infrarrojo cercano (NIR)

El espectrómetro utilizado para adquirir los datos espectrales fue un espectrómetro NIR PSS 2120 (Polytec GmbH, Waldbronn, Alemania), que opera en el rango 1.100-2.100 nm. Este incluye un policromador y un detector de red de diodos de arseniuro de galio e indio (InGaAs). El instrumento presenta un cabezal del sensor basado en una lámpara halógena de 20 W de wolframio para la captación de luz, una unidad de procesamiento y una fibra óptica que los une (*Figura 3.14*). El cabezal del sensor tiene integrado un mecanismo de referencia blanco (Spectralon™) y oscuro, que se activa con el *software*.



**Figura 3.14.** Espectrómetro NIR PSS 2120.

#### 3.2.1.4. Refractómetro

El refractómetro utilizado para realizar la medición del parámetro °Brix, utilizado como medida de referencia para el diseño de los modelos de calibración, fue un refractómetro digital DBR-95 (XS, Carpi MO, Italia) (*Figura 3.15*).





**Figura 3.15.** Refractómetro digital DBR-95.

### 3.2.1.5. Cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas (GC-MS)

El equipo cromatográfico que se utilizó para la medida de los compuestos volátiles de las muestras utilizadas para la obtención de los modelos de calibración pertenece al grupo “*Cátedra de Química Agrícola*” de la Universidad de Castilla-La Mancha - Campus de Albacete. Se trata de un GC (Agilent 7890A) acoplado a un MS (Agilent 5975C) con cuadrupolo simple de ionización electrónica. El equipo tiene instalado un sistema de automuestreador (GERSTEL), que consistía en un MPS, equipado con una bandeja de tubos de 98 posiciones, una TDU y un CIS-4 conectado a un dispositivo de enfriamiento criostático (CCD2, *Cryostatic Cooling Device*) (GERSTEL) (*Figura 3.16*). La columna cromatográfica es la misma que se utilizó para la optimización del método analítico (*Apartado 3.1.1.3*).



**Figura 3.16.** Cromatógrafo de gases (Agilent 7890A) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5975C).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.2. Características y localización de las áreas de muestreo

En este apartado se van a describir las parcelas de las dos variedades, Tempranillo Blanco y Tempranillo, con las que se realizó la adquisición de espectros mediante HSI y NIRS y la medida de su composición aromática mediante TF-SPME-GC-MS y de los TSS mediante refractometría (*Figura 3.17*).

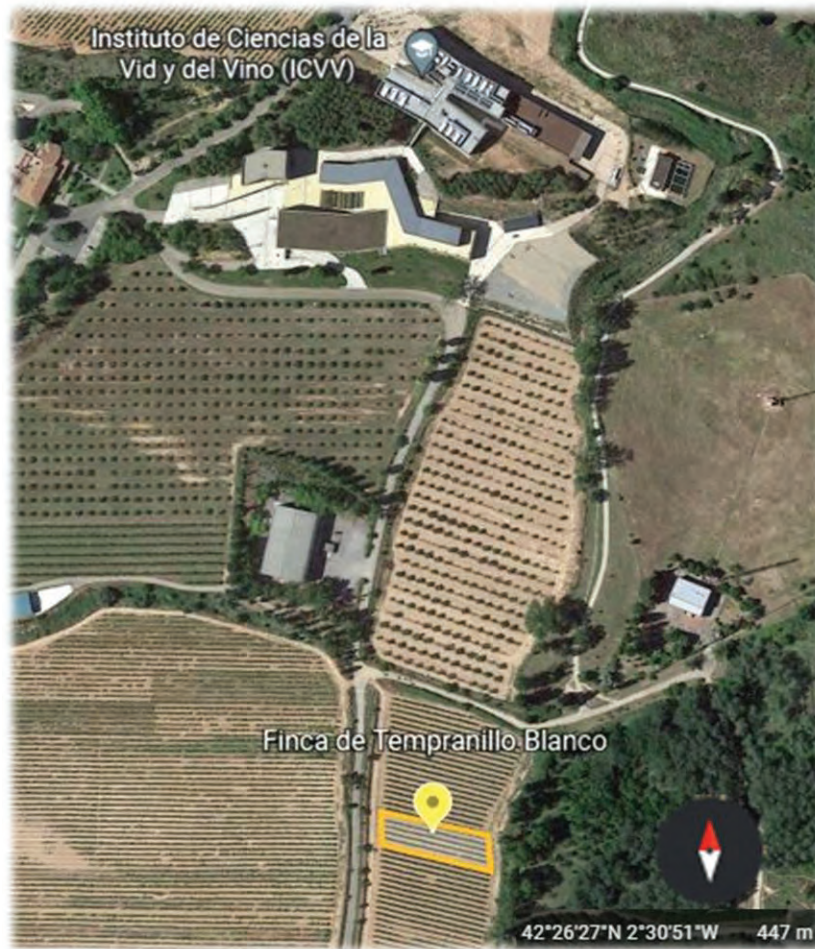


**Figura 3.17.** Situación de las parcelas donde se tomaron las muestras de Tempranillo Blanco y Tempranillo dentro de la D.O.C.a. Rioja.

##### 3.2.2.1. Parcela de Tempranillo Blanco

Los racimos de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco se recolectaron al azar, de forma manual, de dos hileras de una parcela propiedad del Gobierno de La Rioja, situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España), dentro de la zona Rioja Alta y al lado del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino. Las coordenadas de la parcela son: 42°26'27''N y 2°30'51''O, a una altitud de 447 m.s.n.m. El viñedo fue plantado en el año 2002, siguiendo una orientación Este-Oeste. Las cepas fueron injertadas sobre un portainjerto 110-Richter, y se condujeron en un sistema de emparrado vertical, con un espacio entre filas de 3,00 m y entre cepas dentro de la hilera de 1,10 m, dando una densidad de 3.030 plantas/ha (*Figura 3.18*).

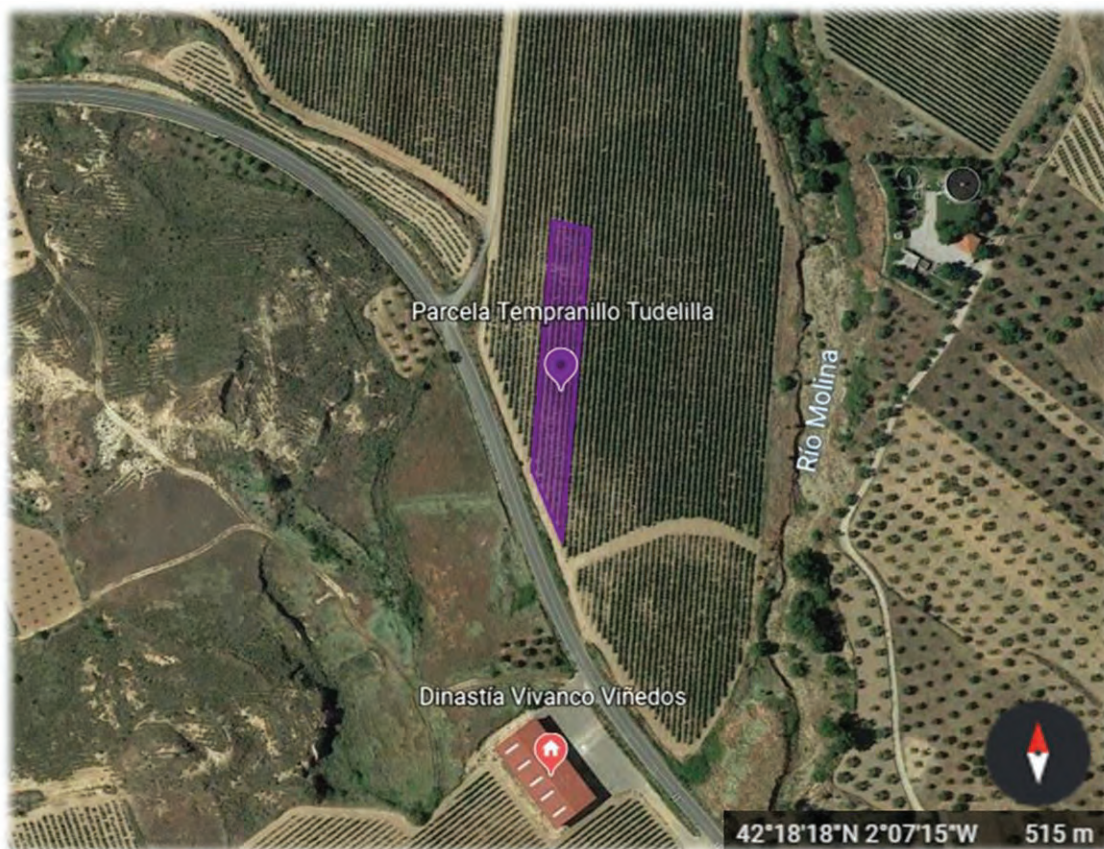




**Figura 3.18.** Parcela de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco situada en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).

#### 3.2.2.2. Parcela de Tempranillo

Los racimos de *Vitis vinifera* L. Tempranillo fueron recogidos manualmente en un viñedo situado en Tudelilla (La Rioja, España). Las coordenadas de la parcela son  $42^{\circ}18'18''\text{N}$  y  $2^{\circ}07'15''\text{O}$ , a una altitud de 515 m.s.n.m. El viñedo fue plantado en 2002, con cepas del clon 776 de Tempranillo, injertadas sobre un portainjerto 110-Ritcher. Las vides se condujeron en espaldera vertical sobre un sistema de doble cordón *Royat*. El espacio entre hileras es de 2,60 m y de 1,20 m entre cepas dentro de cada hilera, con una densidad de plantación de 3.205 plantas/ha y una orientación Norte-Sur (*Figura 3.19*).



**Figura 3.19.** Parcela de *Vitis vinifera* L. Tempranillo situada en Tudelilla (La Rioja, España).

#### 3.2.3. Toma de las muestras para la adquisición de espectros y la medida de su composición aromática y de los TSS

La toma de muestras se realizó desde el envero hasta post-vendimia, con el objetivo de cubrir el máximo rango de maduración de las uvas, para ambas variedades, en las añadas 2019 y 2020.

##### 3.2.3.1. Tempranillo Blanco

Durante la campaña de 2019, se recogieron racimos semanalmente, durante 5 semanas, desde agosto hasta septiembre. Las fechas en las que se recogieron los racimos fueron las siguientes: 12, 19 y 26 de agosto, y 2 y 9 de septiembre. Durante la campaña de 2020, también se recogieron racimos semanalmente, esta vez durante 7 semanas, desde julio hasta septiembre. Las fechas en las que se

### 3.2. Uso de la HSI y la NIRS para la predicción de la composición aromática

recolectaron los racimos fueron: 29 de julio, 5, 12, 19 y 26 de agosto, y 2 y 9 de septiembre (*Tabla 3.12*).

**Tabla 3.12.** Fechas de recogida de las muestras en las campañas de 2019 y 2020 para la variedad *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco.

1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
12/08/2019	19/08/19	26/08/2019	02/09/2019	09/09/2019	-	-
29/07/2020	05/08/2020	12/08/2020	19/08/2020	26/08/2020	02/09/2020	09/09/2020

Para llevar a cabo la recogida de muestras, se seleccionaron dos hileras de la parcela de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco. En cada fecha se llenaron 25 bolsas, con 2-3 racimos cada una, seleccionados de forma aleatoria a lo largo de las dos hileras (*Figura 3.20*). El mismo día de la recogida se congelaban los racimos a -20 °C hasta el momento de la preparación de las muestras.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

1 y 3: filas muestreo  
 ( ): número de cepa  
 X: cepas muestreo  
 0: cepas libres



(53) X		(41) X
(52) X		(40) X
(51) X		(37-39) 0
(50) X		(36) X
(39-49) 0		(35) X
(38) X		(34) X
(37) X		(33) X
(36) 0		(32) X
(35) X		(31) X
(34) X		(30) X
(33) X		(29) X
(32) X		(28) X
(29-31) 0		(27) X
(28) X		(26) 0
(27) X		(25) X
(26) 0		(24) X
(25) X		(23) X
(24) X		(22) 0
(23) X		(21) X
(22) X		(19-20) 0
(21) X		(18) X
(20) 0		(17) X
(19) X		(16) 0
(18) X		(15) X
(17) X		(14) X
(16) 0		(13) 0
(15) X		(12) X
(14) X		(11) 0
(13) X		(10) X
(11-12) 0		(9) X
(10) X		(8) X
(9) X		(7) 0
(8) X		(6) X
(7) X		(5) X
(6) X		(2-4) 0
(2-5) 0		
1	2	3

**Figura 3.20.** Esquema de la parcela de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco en la Finca de La Grajera (Logroño, La Rioja, España).

### 3.2.3.2. Tempranillo

Durante la campaña de 2019, se recogieron racimos semanalmente, durante cinco semanas, desde agosto hasta septiembre. Las fechas en las que se recogieron los racimos fueron las siguientes: 19 y 26 de agosto, y 2, 9 y 16 de septiembre. Durante la campaña de 2020, se recogieron racimos semanalmente, durante siete semanas. Las fechas en las que se recogieron los racimos fueron las siguientes: 5, 12, 19 y 26 de agosto, y 2, 9 y 16 de septiembre (*Tabla 3.13*).

**Tabla 3.13.** Fechas de recogida de las muestras en las campañas de 2019 y 2020 para la variedad *Vitis vinifera* L. Tempranillo.

1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
19/08/2019	26/08/2019	02/09/2019	09/09/2019	16/09/2019	-	-
05/08/2020	12/08/2020	19/08/2020	26/08/2020	02/09/2020	09/09/2020	16/09/2020

Para llevar a cabo el muestreo de *Vitis vinifera* L. Tempranillo, se seleccionaron cinco filas de la parcela (*Figura 3.21*). Las filas en las que se realizó el muestreo fueron la 1, 3 y 5. De cada fila se seleccionaron tres bloques, dando un total de nueve bloques seleccionados (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 y B9), cada bloque se componía de 5 foros (F1, F2, F3, F4 y F5), de los cuales se muestreaban tres (F2, F3 y F4), dejando los foros de los extremos sin muestrear (F1 y F5). De cada foro, que estaba compuesto por cinco cepas cada uno, se recogía una bolsa con 2-3 racimos, por lo que se recogieron un total de 27 bolsas por fecha (9 bloques x 3 foros muestreados). El mismo día de la recogida se congelaban los racimos a -20 °C hasta el momento de la preparación de las muestras.

El motivo de realizar el muestreo de Tempranillo de este modo fue que la parcela ya estaba dividida de esta forma por otros ensayos que se realizaron anteriormente.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

1,3,5: Filas muestreo  
**B1-B9:** Bloques muestreo  
**F2-F4:** Foros muestreo  
**F(0):** Foros libres

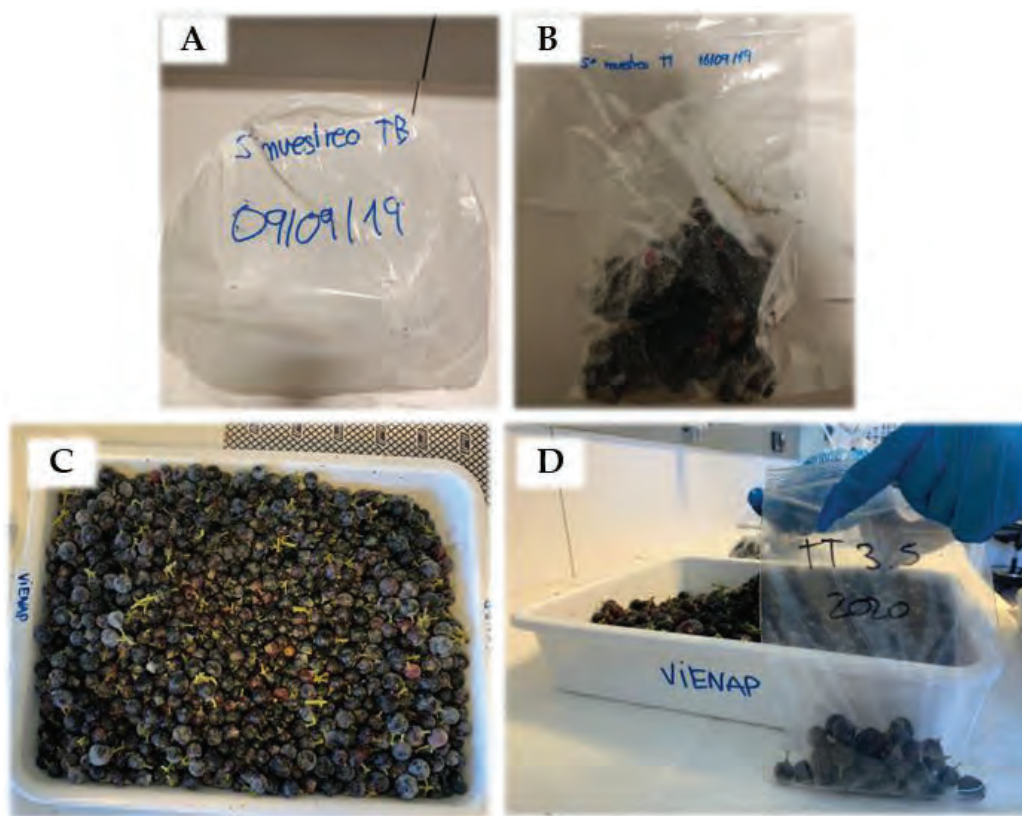


F1		F1		F1
<b>F2</b>		<b>F2</b>		<b>F2</b>
<b>F3</b> <b>B7</b>		<b>F3</b> <b>B4</b>		<b>F3</b> <b>B1</b>
<b>F4</b>		<b>F4</b>		<b>F4</b>
F5		F5		F5
<b>F(0)</b>		<b>F(0)</b>		<b>F(0)</b>
F1		F1		F1
<b>F2</b>		<b>F2</b>		<b>F2</b>
<b>F3</b> <b>B8</b>		<b>F3</b> <b>B5</b>		<b>F3</b> <b>B2</b>
<b>F4</b>		<b>F4</b>		<b>F4</b>
F5		F5		F5
<b>F(0)</b>		<b>F(0)</b>		<b>F(0)</b>
F1		F1		F1
<b>F2</b>		<b>F2</b>		<b>F2</b>
<b>F3</b> <b>B9</b>		<b>F3</b> <b>B6</b>		<b>F3</b> <b>B3</b>
<b>F4</b>		<b>F4</b>		<b>F4</b>
F5		F5		F5
1	2	3	4	5

**Figura 3.21.** Esquema de la parcela de *Vitis vinifera* L. Tempranillo (Tudelilla, La Rioja, España).

#### 3.2.4. Preparación de las muestras para la adquisición de espectros y la medida de su composición aromática y de los TSS

Una vez recogidas las muestras de las dos variedades (Tempranillo Blanco y Tempranillo) en las dos añadas (2019 y 2020), y previamente a la adquisición de los espectros, al análisis de compuestos volátiles y a la medida del °Brix, se procedió a la preparación de las muestras. Para ello, se desgranaron, sin descongelar, todos los racimos de una misma fecha en una bandeja. Posteriormente, se mezclaron bien todas las bayas con el fin de conseguir homogeneidad. Una vez homogeneizadas, se prepararon 20 muestras para cada fecha formadas por 64 bayas cada una (*Figura 3.22*).



**Figura 3.22.** Esquema de la preparación de las muestras de una fecha de Tempranillo. A) Bolsa de una fecha con 27 bolsas pequeñas, B) bolsa pequeña con 2-3 racimos, C) bandeja con las bayas de todos los racimos desgranados, D) selección aleatoria de las 64 bayas de una muestra.

Una vez finalizado todo el proceso, se obtuvieron 100 muestras de cada variedad (5 fechas x 20 muestras de cada fecha) para el año 2019, y 140 muestras de cada variedad (7 fechas x 20 muestras de cada fecha) para el año 2020, dando un total de 240 muestras para Tempranillo Blanco y 240 muestras para Tempranillo (*Tabla 3.14*). De este modo nos aseguramos tener el número suficiente de muestras para diseñar modelos de calibración robustos.

**Tabla 3.14.** Número de muestras por fecha, año y totales para cada una de las variedades (Tempranillo Blanco y Tempranillo).

	Fechas							$\Sigma$
	1	2	3	4	5	6	7	
2019	20	20	20	20	20	-	-	100
2020	20	20	20	20	20	20	20	140
								240

#### 3.2.5. Medidas espectrales mediante HSI y NIRS

Antes de llevar a cabo la toma de las medidas espectrales, en primer lugar, se sacaban las muestras que se iban a medir ese día para su descongelación. En segundo lugar, se encendían las lámparas de la cámara hiperespectral 30 minutos antes de la toma de muestras y la lámpara del NIR 1 hora antes de la toma de muestras. Por último, se bajaban las persianas y se apagaban las luces del laboratorio con el fin de evitar cualquier tipo de interferencia lumínica.

Una vez descongeladas y atemperadas las muestras, y cuando ya había pasado el tiempo necesario para que se calentasen las lámparas, se comenzaba con las medidas espectrales. En primer lugar, se realizaba la adquisición de las medidas espectrales con la cámara hiperespectral en el rango VIS+SW-NIR (400-1.000 nm), y después se adquirían los espectros con el espectrómetro NIR (1.100-2.100 nm).

##### 3.2.5.1. Adquisición de imágenes hiperespectrales en el rango VIS+SW-NIR

Las imágenes hiperespectrales se adquirieron en condiciones de laboratorio utilizando la cámara descrita en el *Apartado 3.2.1.2*, conectada a un ordenador que tenía instalado el *Software SpectrononPro (Figura 3.12)*. La resolución espectral de la cámara fue de 2,1 nm, lo que daba un total de 300 bandas en el rango de 400 a 1.000 nm. La cantidad de información captada por el sensor en cada línea espacial (columna) de la imagen hiperespectral fue de 900 píxeles, y el número total de líneas fue de 725. El tiempo de integración de cada línea fue de 30 fps (33,33 ms), por lo que el tiempo total que tardaba la cámara en generar una imagen fue de 24,16 s (33,33 ms x 725 líneas). La cámara hiperespectral estaba situada a 480 mm de las muestras de uva y estas se iluminaron con cuatro lámparas halógenas de 50 w (*Figura 3.12*).

Antes de comenzar con la medida de las muestras, se tomó una referencia de blanco, colocando el Spectralon (*Figura 3.13 A*) a la misma distancia que se



situaban posteriormente las muestras y adquiriendo la imagen hiperespectral. Después se tomó la referencia oscura colocando el tapón en el objetivo de la cámara (*Figura 3.13 B*).

Una vez adquiridas ambas referencias se llevó a cabo la medida espectral de las muestras. Cada muestra se componía de 64 bayas y, puesto que en los dos porta muestras cabían un total de 32 bayas, se obtuvieron y adquirieron dos submuestras de cada muestra. De este modo nos aseguramos de que todas las bayas fuesen empleadas para las medidas. Para ello se colocaron las primeras 32 bayas, previamente descongeladas y secadas con un papel (*Figura 3.23A*), con el pedicelo de las bayas hacia abajo, para evitar diferencias entre la superficie de la baya y el pedicelo y repartidas en dos porta muestras de 16 posiciones (*Figura 3.23B*), y se adquirió la imagen hiperespectral de esas 32 bayas, a la que llamaremos submuestra 1. Una vez terminado el tiempo de adquisición de la primera submuestra se retiraban esas 32 bayas y se colocaban las 32 restantes, de este modo obteníamos la submuestra 2. Este proceso se repitió para las 240 muestras de Tempranillo Blanco y para las 240 muestras de Tempranillo. Entre muestra y muestra se limpiaba la placa con papel para eliminar residuos anteriores. En la *Figura 3.23* se muestra un esquema del proceso de medida de imágenes hiperespectrales.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura 3.23.** Proceso de adquisición de imágenes hiperespectrales. A) Muestras en el momento de descongelación y secado, B) porta muestras con una submuestra de 32 bayas, y C) adquisición de imagen hiperespectral de una submuestra.

La información bruta que proporcionaba la cámara, adquirida como intensidad luminosa, se tradujo a reflectancia ( $R$ ) mediante la siguiente ecuación (*Ecuación 3.1*),

$$R(\lambda) = \frac{G(\lambda) - D(\lambda)}{W(\lambda) - D(\lambda)} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde  $\lambda$  es la longitud de onda (nm),  $G$  es la intensidad de la luz reflejada por las bayas,  $W$  es la intensidad de la luz procedente de la referencia del blanco y  $D$  es la intensidad de la luz procedente de la referencia oscura.

Puesto que el software estaba configurado para absorbancia, la reflectancia ( $R$ ) se convirtió a absorbancia mediante la siguiente ecuación (*Ecuación 3.2*).

$$A(\lambda) = \log \frac{1}{R} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

### 3.2.5.2. Adquisición de medidas espectrales mediante espectroscopía NIR

Los datos espectrales se adquirieron utilizando el espectrómetro descrito en el *Apartado 3.2.1.3* en condiciones de laboratorio, inmediatamente después de terminar la adquisición de las imágenes hiperespectrales.

El espectrómetro tiene una resolución de 2 nm, con 501 *data points* por espectro. La toma de espectros se realizó a temperatura ambiente, en modo de reflectancia, y mediante una media de 32 barridos. La altura entre el cabezal del sensor y el porta muestras donde se colocaban las bayas es de 250 mm. La referencia blanca y negra están integradas en el sensor, por lo que el *software* PSS-HOP las toma automáticamente. Las referencias se realizaban antes de comenzar con la medida de las muestras, y cada 200 espectros aproximadamente.

Una vez adquiridas las referencias, se comenzó con la medida de muestras. Para ello se midieron y promediaron 8 submuestras compuestas por 8 bayas cada una, midiendo así las 64 bayas que conforman una muestra. Estas bayas se colocaron en un porta muestras dentro de la zona de medición, con el pedicelo de las bayas hacia abajo, para evitar diferencias entre la superficie de la baya y el pedicelo (*Figura 3.24*). Este proceso se repitió para las 240 muestras de Tempranillo Blanco y para las 240 muestras de Tempranillo. Entre muestra y muestra se limpiaba la placa con papel para eliminar residuos anteriores.

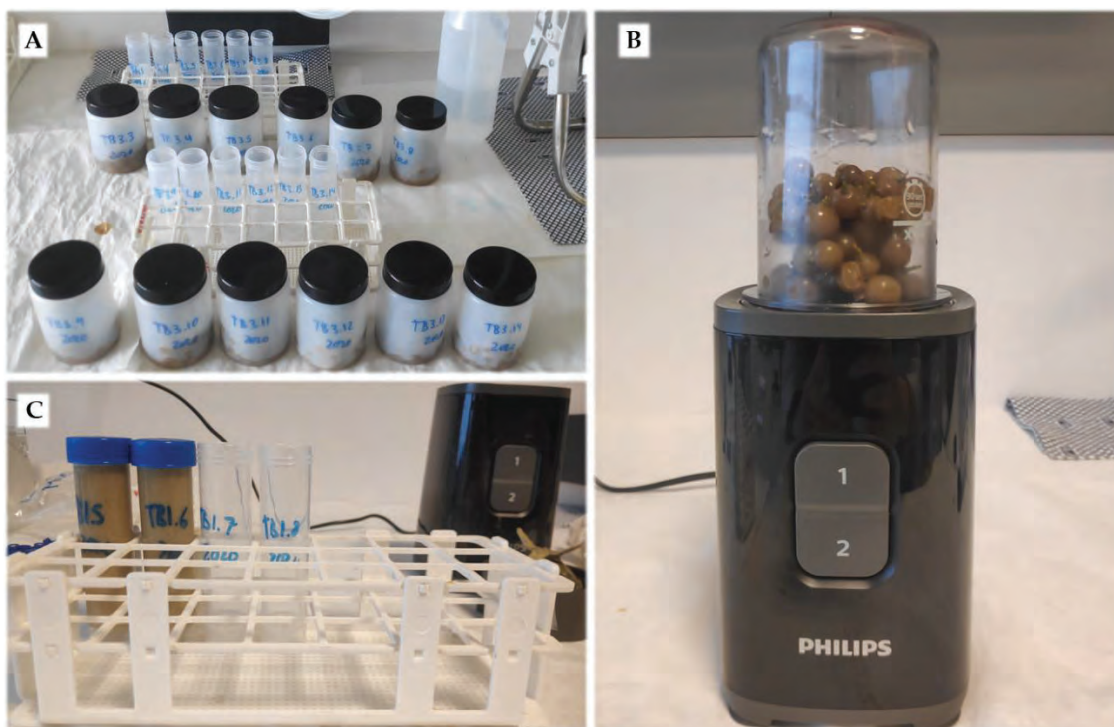


**Figura 3.24.** Submuestra de 8 bayas de una de las muestras de Tempranillo Blanco preparada para ser medida en el espectrómetro NIR.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros se corrigieron utilizando los valores de referencia blanco y oscuro, siguiendo la *Ecuación 3.1*. A continuación, la reflectancia (R) se convirtió en absorbancia siguiendo la *Ecuación 3.2*.

Una vez terminada la adquisición de medidas espectrales, tanto de las imágenes hiperespectrales como de los espectros NIR, se trituraron las 64 bayas de cada muestra con la batidora durante 30 s, y se añadió la pasta a un tubo Falcon de 50 mL. Los Falcon se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización para el análisis de compuestos volátiles mediante TF-SPME-GC-MS, y la medida de los sólidos solubles totales (TSS, *Total Soluble Solids*) ( $^{\circ}$  Brix) mediante refractometría. En la *Figura 3.25* se muestra un esquema del proceso de triturado de muestras.



**Figura 3.25.** Esquema del triturado de muestras posterior a la adquisición de medidas espectrales. A) 12 muestras con sus respectivos tubos Falcon preparadas para ser trituradas, B) las 64 bayas de una muestra dentro de la batidora, y C) tubos Falcon con la pasta de las 64 bayas.

### 3.2.6. Análisis de compuestos volátiles en mostos de Tempranillo y Tempranillo Blanco mediante TF-SPME-GC-MS

El método utilizado para el análisis de compuestos volátiles en las muestras de *Vitis vinifera* L. Tempranillo y Tempranillo Blanco fue el definido en el [Apartado 3.1.8](#) y optimizado en Marín-San Román et al. (2022), con pequeñas modificaciones para mejorar la extracción de los compuestos de interés y la resolución de los cromatogramas. Este método se utilizó para la obtención de los valores de referencia utilizados en la construcción de los modelos de calibración.

#### 3.2.6.1. Extracción de compuestos volátiles del mosto mediante TF-SPME

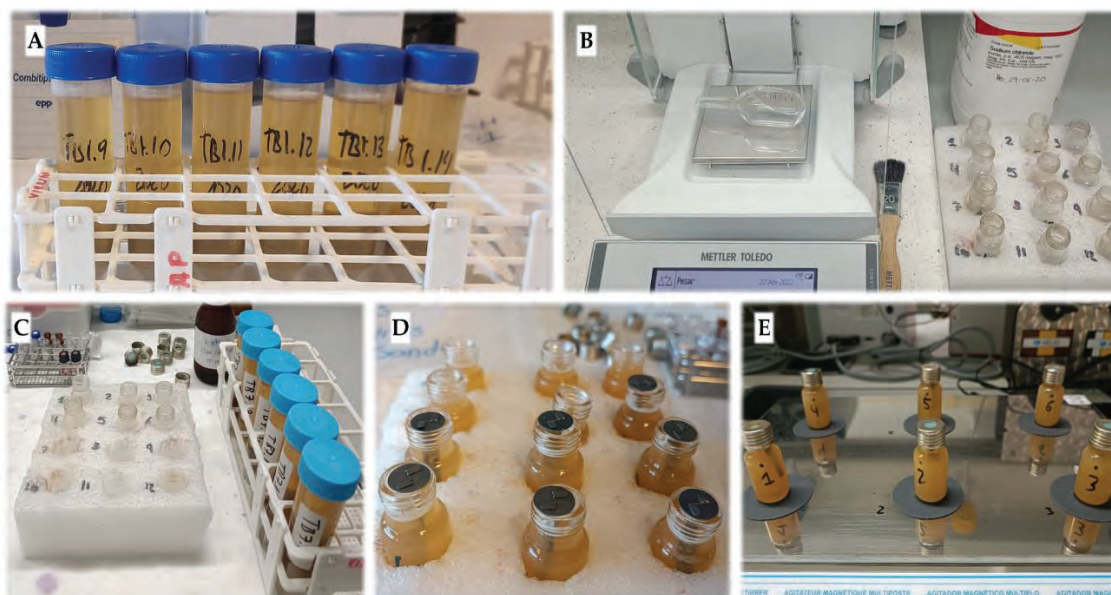
El día anterior a realizar la extracción, se descongelaron las muestras a las que se les iba a realizar el análisis de compuestos volátiles. Una vez descongeladas, se centrifugaban a 3.900 rpm, durante 15 minutos ([Figura 3.26A](#)).

Para llevar a cabo la extracción, se añadió una alícuota de 9 mL del mosto centrifugado, 25  $\mu$ L del patrón interno (2-octanol, 5  $\mu$ L de 2-octanol/100 mL de EtOH) y 2,5 g de NaCl en un vial de 10 mL con tapón de rosca ([Figuras 3.26B y C](#)). La modificación realizada respecto al método optimizado fue la adición de NaCl, que se empezó a utilizar por recomendación del proveedor de las TFs. Finalmente, se añadió un agitador magnético de vidrio de borosilicato, y se introdujo la TF de PDMS/CAR sujeta en el inserto de metal para TFs ([Figura 3.26 D](#)). Se repitió lo mismo para todas las muestras del día. La extracción de todas las muestras se realizó a temperatura ambiente, durante 6 horas, y a 500 rpm ([Figura 3.26 E](#)). Una vez finalizado el tiempo de extracción, se retiraron las TFs con unas pinzas, se limpiaron con abundante H<sub>2</sub>O destilada, y se secaron con un papel. Una vez secas, se trasladaron a los tubos de desorción situados en la bandeja de 98 posiciones del automuestreador. El esquema de la preparación de la muestra



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

para la extracción de compuestos volátiles en las muestras de mosto se puede ver en la *Figura 3.26*.



**Figura 3.26.** Esquema del proceso de preparación de la muestra para la extracción de compuestos volátiles mediante TF-SPME en muestras de mosto de Tempranillo Blanco. A) Muestras centrifugadas, B) adición de NaCl, C) adición del mosto y del 2-octanol (P.I.) a los viales de TF-SPME, D) inserto de metal con las TFs suspendidas dentro del vial y E) viales en el agitador multiposición en el momento de la extracción.

#### 3.2.6.2. Condiciones de desorción para la TF-SPME-GC-MS

Las condiciones de desorción utilizadas fueron las descritas en el *Apartado 3.1.8.4*, con la única diferencia de que, en este caso, para enfriar el CIS-4 se utilizó el dispositivo CCD2 en vez de N<sub>2</sub> líquido. La desorción de los compuestos volátiles se realizó en la TDU (*Figura 3.11F*), a una presión constante de 20,75 psi. La TDU se programó de 40 °C a 250 °C mediante una rampa de temperatura de 60 °C/min, y se mantuvo a 250 °C durante 5 min. Los analitos se retuvieron en el CIS-4, que contenía el *liner* de Tenax TA™, a -40 °C con refrigeración mediante el CCD2. Tras la desorción y la concentración de los analitos en el CIS-4, este se calentó de -40 °C a 230 °C a una velocidad de 12 °C/s, y se mantuvo a esa temperatura durante 5 minutos para terminar de transferir los analitos a la

columna cromatográfica. Las condiciones de la desorción se pueden observar en la *Tabla 3.11*.

### 3.2.6.3. Condiciones cromatográficas para la TF-SPME-GC-MS

Una vez transferidos los compuestos volátiles a la columna cromatográfica, se separaron en el GC y se detectaron en el MS de simple cuadrupolo (Q). El horno fue programado de los 40 °C hasta los 230 °C mediante cuatro rampas de temperatura. Se mantuvo a 40 °C durante 2 minutos y subió hasta los 80 °C, mediante la primera rampa de 5 °C/min, donde se mantuvo otros 2 min. La segunda rampa fue de 10 °C/min hasta los 130 °C, donde se mantuvo 5 minutos. La tercera rampa fue de 5 °C/min hasta los 150 °C, donde se mantuvo otros 5 minutos. La cuarta rampa fue de 10 °C/min hasta la temperatura final de 230 °C, donde se mantuvo los últimos 5 minutos. La adquisición en el detector (MS) se realizó en *Full Scan*, o barrido completo, de todos los iones comprendidos entre 35 y 180 *m/z*, con una energía de ionización de 70 eV. Los compuestos se identificaron utilizando el tiempo de retención obtenido con sus patrones comerciales, y también comparando el espectro de masas de cada compuesto con los de la librería NIST, cuando era necesario. La integración de los cromatogramas se realizó en el EIC, extrayendo el ion principal de cada compuesto. Los iones utilizados para cada compuesto aparecen en la *Tabla 3.15*. La cuantificación de los compuestos volátiles del mosto se realizó usando las curvas de calibrado de los patrones comerciales. Las condiciones del GC-MS se pueden ver resumidas en la *Tabla 3.16*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**Tabla 3.15.** Lista de compuestos volátiles identificados en las muestras de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco y Tempranillo mediante TF-SPME y valores de *m/z* utilizados para su integración.

<b>Compuesto</b>	<b><i>m/z</i></b>	<b>Compuesto</b>	<b><i>m/z</i></b>
(E)-2-hexenal	<b>41</b>	Citral	
		$\beta$ -Damascenona	<b>69</b>
		Geraniol	
Ácido acético	<b>43</b>	Linalool	<b>71</b>
<b>2-Octanol (P.I.)</b>	<b>45</b>	Benzaldehído	<b>77</b>
Hexanal		Alcohol bencílico	<b>79</b>
1-Hexanol	<b>56</b>		
(E)-2-Hexen-1-ol	<b>57</b>	2-Feniletanol	<b>91</b>
$\alpha$ -Terpineol	<b>59</b>	<i>p</i> -Cimeno	<b>119</b>
Ácido hexanoico			
Ácido octanoico		$\beta$ -Ionona	<b>177</b>
Ácido nonanoico	<b>60</b>		
Ácido decanoico			
(Z)-3-Hexen-1-ol	<b>67</b>		



**Tabla 3.16.** Condiciones cromatográficas del método de TF-SPME-GC-MS utilizadas para determinar los compuestos volátiles de las muestras de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco y Tempranillo.

<b>CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS</b>		
<b>COLUMNA</b> <b>BP21</b>	Formato	Capilar
	Recubrimiento	Sílice fundida
	Dimensiones	
	Largo	30 m
	Diámetro interno	0,25 mm
	Espesor de película	0,25 $\mu$ m
<b>HORNO</b>	T <sup>a</sup> inicial	40 °C
	Tiempo de espera	2 min
	Rampa 1	
	Velocidad	5 °C/min
	Temperatura	80 °C
	Tiempo de espera	2 min
	Rampa 2	
	Velocidad	10 °C/min
	Temperatura	130 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 3	
	Velocidad	5 °C/min
	Temperatura	150 °C
	Tiempo de espera	5 min
	Rampa 4	
	Velocidad	10 °C/min
Temperatura	230 °C	
Tiempo de espera	5 min	
<b>MS</b>		
	Modo <i>Full Scan</i>	35 -180 <i>m/z</i>
	Energía ionización	70 eV

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.2.6.4. Curvas de calibrado

Las disoluciones patrón, que contenían diferentes concentraciones de los patrones comerciales, fueron preparadas en 50 mL de EtOH, y se extrajeron, desorbieron y cuantificaron del mismo modo que las muestras. Cada disolución fue analizada por triplicado ( $n = 3$ ). Los patrones comerciales utilizados para elaborar las curvas de calibrado, así como su coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se pueden ver en la *Tabla 3.17*. La concentración de los compuestos volátiles de los que no se disponía su patrón comercial, se calculó utilizando la curva de calibración de un compuesto de la misma familia, y que se encontraba en un rango de concentración similar. De este modo, para el citral se utilizó la curva del linalool; para el *p*-cimeno, la curva del  $\alpha$ -terpineol; para los ácidos acético, hexanoico y nonanoico, la curva del ácido decanoico; y para el (Z)-3-hexen-1-ol, la curva del (E)-2-hexen-1-ol.

**Tabla 3.17.** Patrones comerciales con los que se realizaron las curvas de calibración, y sus coeficientes de determinación ( $R^2$ ).

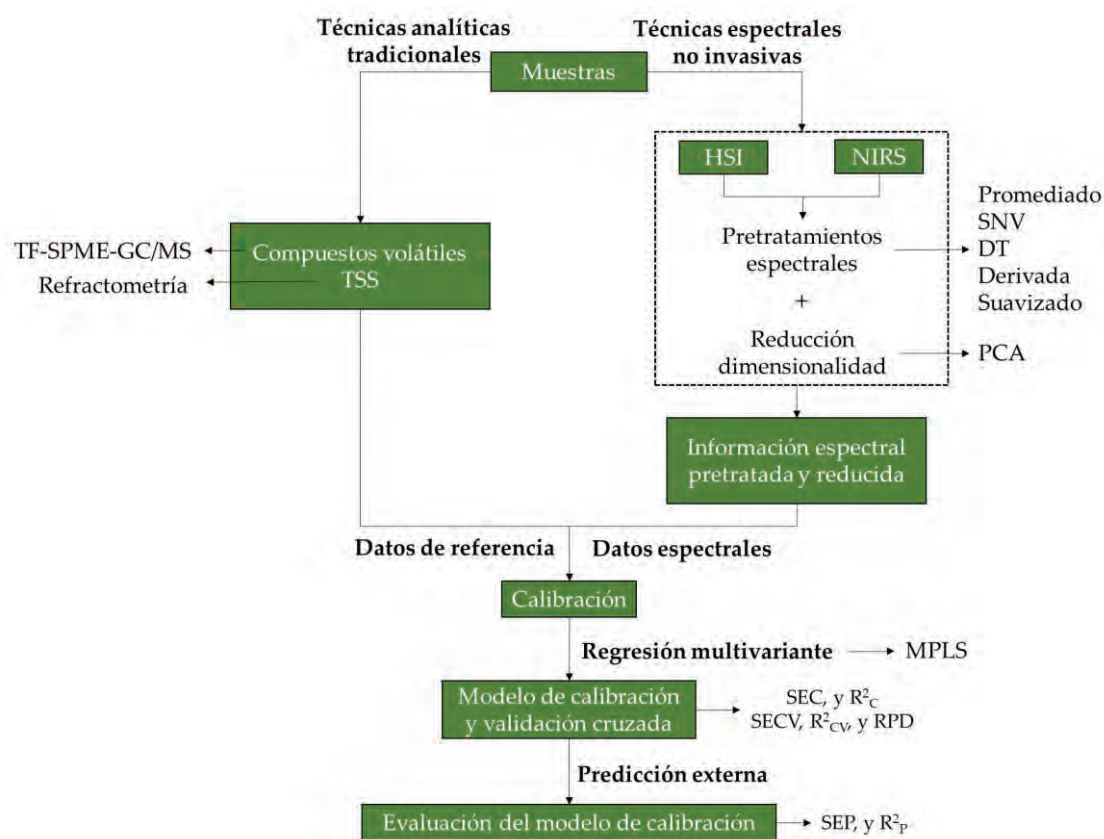
Compuesto	$R^2$	Compuesto	$R^2$
$\alpha$ -Terpineol	0,9942	Alcohol bencílico	0,9961
Geraniol	0,9154	Ácido octanoico	0,9707
Linalool	0,9643	Ácido decanoico	0,9846
$\beta$ -Damascenona	0,9684	(E)-2-Hexenal	0,9937
$\beta$ -Ionona	0,9803	Hexanal	0,9898
Benzaldehído	0,9684	1-Hexanol	0,9706
2-Feniletanol	0,9853	(E)-2-Hexen-1-ol	0,9748

### 3.2.7. Medida de los sólidos solubles totales (TSS) mediante refractometría

Para la medida del  $^{\circ}$ Brix se utilizó el refractómetro digital DBR-95 (*Apartado 3.2.1.4*). Antes de hacer la medida, se realizó la calibración, añadiendo unas gotas de H<sub>2</sub>O destilada al pocillo del refractómetro. Una vez calibrado y seco, se añadieron unas gotas de la muestra y se midió su  $^{\circ}$ Brix. Se repitió la misma operación para las 480 muestras totales.

### 3.2.8. Análisis estadístico

Una vez adquiridas todas las medidas espectrales (VIS+SW-NIR y NIR) y analizados los compuestos volátiles y los TSS, se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos siguiendo el esquema de la *Figura 3.27*.



**Figura 3.27.** Diagrama de flujo del análisis de datos de imágenes hiperespectrales y espectroscopía NIR para la construcción de los modelos de calibración.

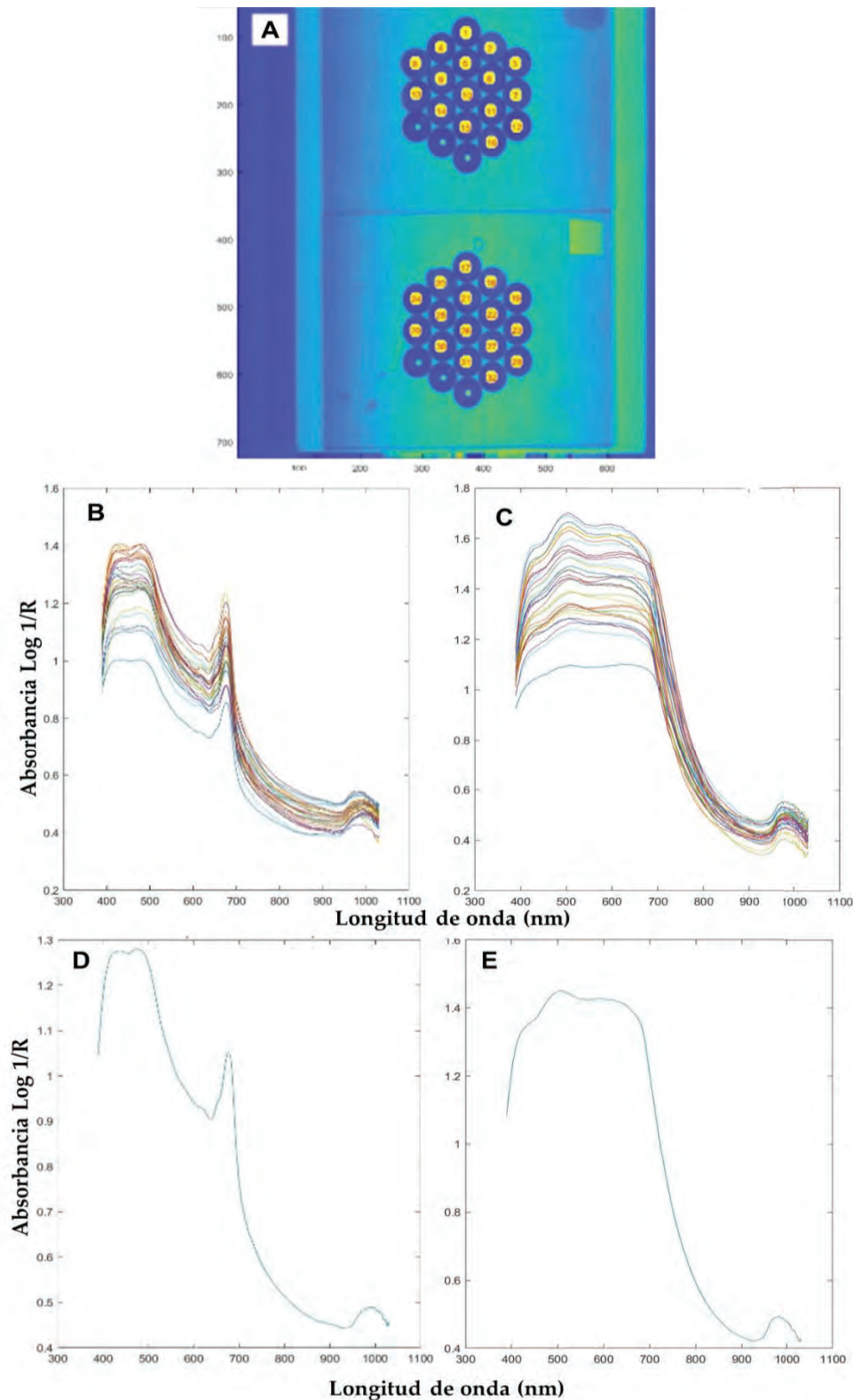
### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.2.8.1. Pretratamientos espectrales

En primer lugar, se realizó el procesamiento de los datos espectrales con el objetivo de reducir o eliminar posibles variaciones en los espectros debidas al ruido (instrumental y/o ambiental). Se comenzó con el promediado de espectros, seguido de la variable normal estándar (SNV), el ajuste de la línea base o *De-Trending* (DT), la derivación y el suavizado.

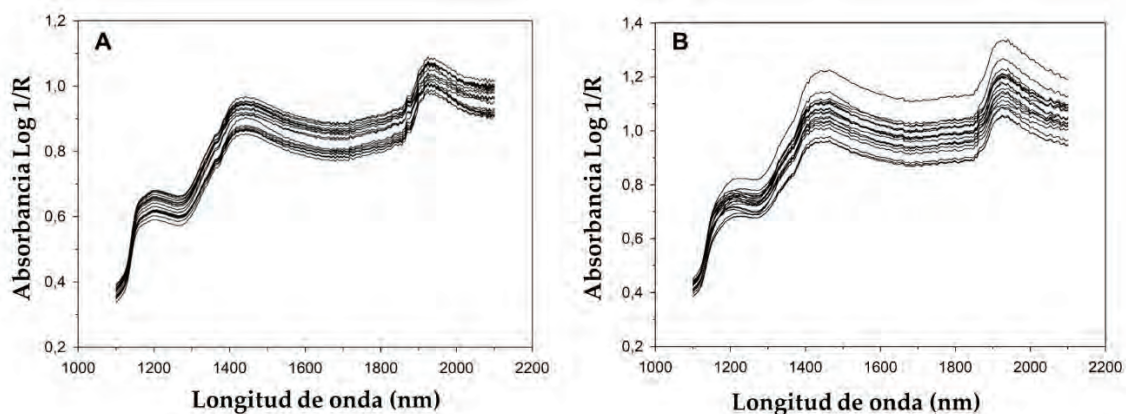
Promediado de espectros. Para cada imagen hiperespectral, compuesta por 32 bayas, un código automatizado, programado en Matlab™, permitió seleccionar las regiones de interés (ROI, *Region of Interest*) relativas a cada una de las 32 bayas, utilizando un diámetro de 7 mm para cada baya (*Figura 3.28A*). Una vez extraídas las ROI, se utilizaron para calcular el espectro promedio de cada baya (*Figuras 3.28B-C*) y el espectro promedio de una submuestra (*Figuras 3.28D-E*). Finalmente se calculó el espectro promedio de la muestra, que estaba compuesto de dos submuestras.



**Figura 3.28.** A) Imagen hiperespectral (VIS+SW-NIR) de 32 bayas colocadas en los dos porta muestras con las regiones de interés (ROI) seleccionadas. B) Espectros de absorbancia media de cada baya de una submuestra de Tempranillo Blanco y C) de una submuestra de Tempranillo. D) Espectro promedio de absorbancia de todas las bayas en una submuestra de Tempranillo Blanco, y E) de una submuestra de Tempranillo.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Por otro lado, los datos espectrales recogidos en el Polytec PSS 2120 se analizaron mediante el *software* SL Utilities (Versión 3.1, Polytec GmbH, Waldbronn, Alemania). El espectro medio de cada muestra se representó promediando los espectros de las 8 submuestras formadas por ocho bayas, es decir, de las 64 bayas (*Figura 3.29*).



**Figura 3.29.** Espectros promedios de cada una de las 20 muestras de una fecha de A) Tempranillo Blanco, y B) Tempranillo, para la región NIR. R: reflectancia.

El resto de pretratamientos espectrales se llevó a cabo en el programa WinISI II (Versión 1.50, Infracsoft International, PortMatilda, PA, EE.UU.), con los espectros promedios de cada muestra.

Variable normal estándar (SNV) y De-Trending (DT). Se llevó a cabo una SNV y un DT para eliminar los efectos de la dispersión y compensar la desviación de la línea base.

Derivada de Savitzky-Golay y suavizado. Se aplicó el proceso de derivada y suavizado probando la primera y segunda derivada, así como diferentes tamaños de ventana.

### 3.2.8.2. Reducción de la dimensionalidad mediante análisis de componentes principales (PCA)

Con el fin de explorar la estructura de los datos, visualizar la presencia de valores atípicos en los espectros, y también identificar las principales fuentes de variabilidad en los espectros se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) con el espectro promedio de cada muestra ya pretratado. El objetivo de este PCA fue reducir la dimensionalidad del problema sin perder información. Finalmente se decidió no considerar anómalo ningún espectro.

### 3.2.8.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS)

Una vez pretratados los espectros, se utilizó la regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS) para la predicción de los valores de compuestos volátiles y de TSS, utilizando los espectros promedios adquiridos en bayas intactas de Tempranillo Blanco y Tempranillo, para los rangos VIS+SW-NIR y NIR. Por lo que se realizaron cuatro conjuntos de datos que se pueden ver en la *Tabla 3.18*.

**Tabla 3.18.** Conjuntos de datos para las dos variedades (Tempranillo Blanco y Tempranillo) y los dos rangos espectrales (VIS+SW-NIR y NIR).

<b>Tempranillo Blanco</b>		
<b>Conjunto 1</b>	Datos espectrales VIS+SW-NIR	Datos de referencia de compuestos volátiles y TSS
<b>Conjunto 2</b>	Datos espectrales NIR	
<b>Tempranillo</b>		
<b>Conjunto 3</b>	Datos espectrales VIS+SW-NIR	Datos de referencia de compuestos volátiles y TSS
<b>Conjunto 4</b>	Datos espectrales NIR	

Cada conjunto de datos estaba compuesto por 240 muestras, excepto el conjunto 1, en el que se perdieron 4 espectros y se realizó con 236 muestras. El conjunto de datos original de cada modelo se dividió en dos conjuntos de datos independientes: un conjunto de calibración, formado por el 80 % de las muestras totales, y un conjunto de predicción, formado por el 20 % restante, elegido de



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

forma aleatoria (*Tabla 3.19*). Cada conjunto incluía muestras distribuidas adecuadamente y que cubrían todo el rango de concentración de compuestos volátiles y de TSS.

**Tabla 3.19.** Número de muestras totales para cada conjunto de datos original y para cada conjunto de datos independiente.

<b>Conjunto 1</b>	236 muestras totales	188 muestras de calibración 48 muestras de predicción
<b>Conjuntos 2, 3, y 4</b>	240 muestras totales	192 muestras de calibración 48 muestras de predicción

El conjunto de datos de calibración se sometió a la eliminación de los valores atípicos químicos (*outliers*), es decir, de los datos de referencia de cada compuesto volátil y de los TSS, en función de su valor en la *t* de Student, utilizando como límite crítico un valor de  $t > 2,5$ . Una vez eliminados los *outliers* de los datos de calibración se construyeron los modelos de calibración y se calcularon los estadísticos de calibración (SEC y  $R^2_c$ ) y de validación cruzada (SECV,  $R^2_{cv}$  y  $RPD_{cv}$ ), para la que se dividió el colectivo de calibración en 4 grupos. El número óptimo de variables latentes (LV) se seleccionó según el que diese un menor SECV, con un máximo de 11 LV.

Para comprobar que las ecuaciones de regresión o modelos de calibración obtenidos eran capaces de predecir muestras totalmente desconocidas, se utilizó el conjunto de datos de predicción para realizar la predicción externa. Esas muestras no formaron parte de las muestras utilizadas para construir los modelos de calibración en ningún momento. Con los datos de predicción se calcularon los parámetros estadísticos de predicción externa (SEP y  $R^2_p$ ).

Finalmente, con los parámetros estadísticos de calibración, de validación cruzada y de predicción externa se evaluaron los modelos. La precisión de calibración depende del error estándar de validación cruzada (SECV) y del error estándar de predicción (SEP). La proporción de varianza explicada de las

### 3.2. Uso de la HSI y la NIRS para la predicción de la composición aromática

---

variables de respuesta se mide con las LV y con los coeficientes de determinación de calibración ( $R^2_c$ ), validación cruzada ( $R^2_{cv}$ ) y predicción externa ( $R^2_p$ ).



# 4.

## RESULTADOS





## 4.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO

### 4.1.1. Artículo 1: Optimización de los métodos de SBSE y <sup>m</sup>SBSE

*Título:* Optimization of stir bar sorptive extraction (SBSE) and multi-stir bar sorptive extraction (<sup>m</sup>SBSE) to improve must volatile compounds extraction

*Publicado en:* LWT - Food Science and Technology 172 (2022) 114182

*Autores:* Marín-San Román, S., Carot-Sierra, J. M., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., y Garde-Cerdán, T.

#### *Resumen*

En este trabajo se optimizó el método de extracción mediante barrita agitadora absorbente (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) y su variante utilizando múltiples barritas agitadoras absorbentes (<sup>m</sup>SBSE, *multi-Stir Bar Sorptive Extraction*), para la extracción de compuestos volátiles del mosto.

Para ello, se realizaron dos diseños factoriales aleatorios en los que se optimizaron los siguientes factores y niveles: para SBSE: modo de extracción (espacio de cabeza (HS, *Head Space*), inmersión directa (DI, *Direct Immersion*), y ambos al mismo tiempo), velocidad de extracción (500 y 1000 rpm), tiempo de extracción (1, 3 y 6 h), temperatura de extracción (20, 40 y 60 °C) y adición de NaCl (con NaCl, sin NaCl y secuencial); y para <sup>m</sup>SBSE: velocidad de extracción (500 y 1000 rpm), tiempo de extracción (1, 3 y 6 h), temperatura de extracción (20, 40 y 60 °C), y adición de NaCl (con y sin).

#### 4. RESULTADOS

---

Como resultado se identificaron un total de 22 compuestos volátiles extraídos con SBSE y 25 extraídos con <sup>m</sup>SBSE. Para la SBSE, se realizó un análisis descriptivo y un análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*), que confirmó los resultados que se pudieron observar en el análisis descriptivo, por lo que no fue necesario realizar ningún análisis de la varianza multifactorial (ANOVA, *Analysis of Variance*). Para la <sup>m</sup>SBSE, se realizó asimismo un PCA. Sin embargo, ningún gráfico mostró la existencia de una combinación de condiciones que se diferenciara claramente del resto, por lo que fue necesario el uso de un ANOVA multifactorial.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el análisis descriptivo, el PCA y en el ANOVA multifactorial (<sup>m</sup>SBSE), se pudo concluir que las mejores condiciones para la extracción de compuestos volátiles en mosto mediante SBSE fueron: el empleo del HS, agitando la muestra a 500 rpm durante 6 horas, a 20 °C, y añadiendo la sal (NaCl) a mitad del tiempo de extracción (3 horas); y para la <sup>m</sup>SBSE: agitación a 500 rpm durante 6 horas, a 60 °C y sin adición de NaCl.

Finalmente, se realizó una comparación entre ambos métodos mediante un ANOVA de un factor, realizando tres extracciones del mosto con la mejor combinación de condiciones obtenida para la SBSE, y otras tres extracciones del mosto con la mejor combinación de condiciones obtenida para la <sup>m</sup>SBSE. Los resultados obtenidos evidenciaron que el método de SBSE proporcionaba una mejor extracción de la mayoría de los compuestos volátiles que el método de <sup>m</sup>SBSE.

En el *Anexo II* se ha realizado una corrección de la Tabla 6 del artículo mostrado a continuación.





Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Optimization of stir bar sorptive extraction (SBSE) and multi-stir bar sorptive extraction (<sup>m</sup>SBSE) to improve must volatile compounds extraction

Sandra Marín-San Román<sup>a</sup>, José Miguel Carot-Sierra<sup>b</sup>, Itziar Sáenz de Urturi<sup>a</sup>, Pilar Rubio-Bretón<sup>a</sup>, Eva P. Pérez-Álvarez<sup>a</sup>, Teresa Garde-Cerdán<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Ctra. de Burgos, Km. 6, 26007, Logroño, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de la Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Optimization  
Extraction  
Grape aroma  
<sup>m</sup>SBSE  
SBSE

### ABSTRACT

The aromatic compounds present in grapes are found in very low concentrations, since, for their determination, a previous step of selective extraction is necessary. In this work we optimize and compare, for the first time, the techniques of extraction by stir bar sorption (SBSE) and multi-stir bar sportive extraction (<sup>m</sup>SBSE), with the aim of analyzing the must volatile composition. For this purpose, two randomized factorial designs were carried out in which the following factors and levels were combined and optimized: for SBSE, extraction mode (headspace (HS), direct immersion (DI), and both at the same time), extraction speed (500/1000 rpm), extraction time (1/3/6 h), extraction temperature (20/40/60 °C) and NaCl addition (with and without NaCl, and sequential); and for <sup>m</sup>SBSE: extraction speed (500/1000 rpm), extraction time (1/3/6 h), extraction temperature (20/40/60 °C), and NaCl addition (with and without). The results showed that SBSE technique provided a higher extraction of volatile compounds than <sup>m</sup>SBSE. After performing principal component analysis (PCA) and analysis of variance (ANOVA) multifactorial, it was concluded that the best conditions for SBSE were: HS, 500 rpm, 6 h, 60 °C and adding NaCl (sequential); and for <sup>m</sup>SBSE were: 500 rpm, 6 h, 60 °C and without NaCl.

### 1. Introduction

Grape volatile composition is one of the most important parameters to determine the quality of must and wine (Aleixandre-Tudo, Weightman, Panzeri, Nieuwoudt, & Du Toit, 2015; Robinson et al., 2014). Grape aromas, also called primary aromas, are composed of varietal and pre-fermentative compounds, and their content depend mainly on the grape variety, climatic conditions and viticultural practices (Marín-San Román, Garde-Cerdán, Baroja, Rubio-Bretón, & Pérez-Álvarez, 2020). The main compounds that form the varietal aroma are: monoterpenoids, C<sub>13</sub> norisoprenoids, benzenoids, esters, thiols and methoxypyrazines (Rubio-Bretón et al., 2019). Within these compounds, monoterpenoids and C<sub>13</sub> norisoprenoids are the compounds that contribute most to wine aroma. On the other hand, within the pre-fermentative aroma, C<sub>6</sub> compounds, known as "green leaf volatiles", can be found (Black, Parker, Siebert, Capone, & Francis, 2015; Rubio-Bretón et al., 2019; Styger, Prior, & Bauer, 2011).

In order to understand the chemical nature of wine aroma, it is necessary to determine and know the aromatic compounds present in

the grape. These compounds are found in very low concentrations, so, in order to carry out their identification and quantification, an efficient pre-concentration method is required prior to their analysis (Marín-San Román, Rubio-Bretón, Pérez-Álvarez, & Garde-Cerdán, 2020; Prestrelo, Barros, Rocha, & Câmara, 2011; Sánchez-Palomo, Alañón, Díaz-Maroto, González-Viñas, & Pérez-Coello, 2009). Sample preparation is a critical step, since a large amount of analyte can be lost (Andrade-Eiroa, Canle, Leroy-Cancellieri, & Cerdà, 2016). In recent years, sample preparation techniques have been evolving, searching for greater accuracy, precision, and sensitivity (Serrano de la Hoz, 2014). For years, different techniques have been used for the extraction of volatile compounds in grapes and wine. The most conventional techniques, such as liquid-liquid extraction (LLE) or solid phase extraction (SPE), have several drawbacks: low selectivity and reproducibility, loss of analytes, difficult automation, and large volumes of solvent and sample (Marín-San Román, Rubio-Bretón, et al., 2020). These reasons encouraged the emergence of solid phase microextraction (SPME) and stir bar sportive extraction (SBSE) which used less solvent volume, could be automated, improved sensitivity, etc ... (Kataoka, Lord, & Pawliszyn,

\* Corresponding author.

E-mail address: [teresa.garde.cerdan@csic.es](mailto:teresa.garde.cerdan@csic.es) (T. Garde-Cerdán).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114182>

Received 16 June 2022; Received in revised form 14 November 2022; Accepted 16 November 2022

Available online 17 November 2022

0023-6438/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



2000; Marín-San Román, Rubio-Bretón, et al., 2020). Both techniques improve the sensitivity since the devices are introduced directly into the thermal desorption system (TD) of the GC. However, SBSE increases the sensitivity by a factor of 50–250 and is much more robust compared to SPME (Marín-San Román, Rubio-Bretón, et al., 2020).

SBSE was first introduced in 1999 (Baltussen, Sandra, David, & Cramers, 1999), is based on the use of a magnetic bar (Twister), encapsulated in a glass cover coated with an absorbent material, which can be used by head space (HS) or by immersion (DI) (Baltussen et al., 1999, 2002). This technique is simple, straightforward to use, environmentally friendly, only require small sample volume, and have low operation costs (Huang et al., 2020). The most used polymeric material for this technique is polydimethylsiloxane (PDMS), due to PDMS has inert character, and is ease of synthesize, has high extraction performance, and its degradation products are easily identifiable (Marín-San Román, Rubio-Bretón, et al., 2020). It has been proven that PDMS Twister does not lose its absorbent capacity until approximately 100 uses. The amount of absorbent can vary from 24  $\mu\text{L}$  to 126  $\mu\text{L}$  depending on the length of the Twister (10 mm or 20 mm). This large phase volume is what allows it to increase the sensitivity with respect to SPME (Bicchi, Iori, Rubiolo, & Sandra, 2002; Lanças, Queiroz, Grossi, & Olivares, 2009; Nogueira, 2012, 2015). A variant of this extraction technique is multi-SBSE ( $^m\text{SBSE}$ ).  $^m\text{SBSE}$  is the only technique so far that combines two magnetic bars with different absorbents, ethylene glycol (EG) and PDMS (Ochiai, Sasamoto, Ieda, David, & Sandra, 2013). EG has a higher affinity for polar compounds than PDMS coating. Combining both of them, it is possible to cover a greater range of polarities (Marín-San Román, Rubio-Bretón, et al., 2020; Ochiai, Sasamoto, David, & Sandra, 2018).

Since the beginning of SBSE, the technique has been widely used for the analysis of volatile compounds in different matrices such as roasted Arabica coffee (Bicchi et al., 2002), water (Ochiai, Sasamoto, Kanda, & Pfannkoch, 2008; Sampedro, Goicolea, Unceta, Sánchez-Ortega, & Barrio, 2009), vinegar (Marrufo-Curtido et al., 2012), drug products (Scherer, Marcseková, Posset, & Winter, 2019), among others. SBSE has also been used, and even optimized, in the analysis of volatile compounds in wine samples, in particular in oak-aged wines (Marín, Zalacain, De Miguel, Alonso, & Salinas, 2005), in Pinot Noir wines (Fang & Qian, 2006), in white wines of six varieties (Zalacain, Marín, Alonso, & Salinas, 2007), in Bordeaux wines (Franc, David, & de Revel, 2009), in Riesling wines (Doneva-Sapceska, Sponholz, & Tasev, 2011), in Graciano wines (Gómez-Caballero et al., 2013), in 15 white, rosé, and red wines (Cacho, Campillo, Viñas, & Hernández-Córdoba, 2013), in Monastrell wines (Pardo-García, De La Hoz, Zalacain, Alonso, & Salinas, 2014), in Chilean sparkling wines (Ubeda, Callejón, Troncoso, Peña-Neira, & Morales, 2016), etc ... Some studies have compared the use of the polymeric phase of EG versus PDMS for the aromatic characterization of wines (Serrano de la Hoz, Salinas, & Ferrandino, 2016; Tang, Hu, Fan, Xu, & Li, 2020; Zhou, Qian, & Qian, 2015). In all of them, better yields are obtained for more polar solutes using the EG phase. However, very few works have been found that study the volatile composition of grape or must using SBSE (Carlomagno, Schubert, & Ferrandino, 2016; Caven-Quantrill & Buglass, 2006, 2011; Martínez-Gil, Garde-Cerdán, Martínez, Alonso, & Salinas, 2011; Pedroza, Zalacain, Lara, & Salinas, 2010; Salinas, Zalacain, Pardo, & Alonso, 2004; Vasile-Simone et al., 2017).

On the other hand, the  $^m\text{SBSE}$  technique has been used for the analysis of volatile compounds in aqueous samples (Ochiai et al., 2013), in beverages (Ochiai, 2018), and in bacterial cultures (Berrou, Dunyach-Remy, Lavigne, Roig, & Cadriere, 2019). In the case of the articles of beverage and aqueous samples, a much higher recovery of polar solutes was obtained with  $^m\text{SBSE}$  than with the conventional SBSE technique. However, no papers have been found that use  $^m\text{SBSE}$  to analyze aromatic compounds in grapes or wines, and seeing the good results obtained in samples of similar characteristics to wine and must, it was decided to also optimize the  $^m\text{SBSE}$  for must samples.

Therefore, the objective of this work was to optimize the SBSE and  $^m\text{SBSE}$  methods for the extraction of volatile compounds in Tempranillo must. The factors and conditions to be tested were chosen based on the existing literature and the Twister manufacturer's recommendations. A design of experiments (DoE) was performed to collect the factors and conditions for each factor. Once the compounds of interest were extracted, they were identified and quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Finally, a comparison was made between the best conditions obtained for SBSE and the best conditions obtained for  $^m\text{SBSE}$ , in order to choose which method best extracts the volatile compounds in Tempranillo must.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and reagents

Chromatographic standards linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -ionone,  $\beta$ -damascenone, 2-phenylethanol, ethyl octanoate, ethyl hexanoate ethyl decanoate, isoamyl acetate, 2-phenethyl acetate, hexanoic acid, octanoic acid, isobutanol (2-methyl-1-propanol), 2-octanol (I.S.), hexanal, amyl alcohol (2-methyl-1-butanol), isoamyl alcohol, and 1-hexanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The reagents ethanol (EtOH), and NaCl were purchased from Merck, water was purified through a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

Twister for SBSE with PDMS (film thickness 0.5 mm, length 10 mm), Twister for SBSE with EG-Silicone (length 10 mm, 32  $\mu\text{L}$  phase volume), liners packed with Tenax TA<sup>TM</sup>, and borosilicate magnetic stirrers were obtained from GERSTEL GmbH & Co (Mülheim an der Ruhr, Deutschland). The capillary column BP21 (50 m length, 0.22 mm i.d., and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) was obtained from SGE (Ringwood, Australia).

Ultra-Turrax was purchased from IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany). Gas chromatograph was purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Multi-purpose autosampler (MPS) and Automated thermal desorption unit (TDU) were provided from GERSTEL. The autosampler system consisted of a multi-purpose sampler (MPS), equipped with tube tray, thermal desorption unit (TDU), and cooled injection system (CIS-4) connected to a N<sub>2</sub> ranger.

### 2.2. Grape paste

The grapes were harvested from a Tempranillo vineyard located in Logroño (La Rioja). For this purpose, 50 vines from this vineyard were marked. The grapes were harvested during the 2019 vintage. A total of 44.4 kg of grapes were obtained. The bunches of grapes were shelled in a box and all the grapes were mixed. Once shelled, all the berries were crushed with the Ultra-Turrax until a homogeneous paste was obtained. Then, 450 Falcon tubes of 50 mL were obtained from this paste, which were frozen for later use.

### 2.3. Standards solution

A solution in which all standards was added. This solution was prepared in 12% EtOH. The concentration of the standards was: 0.001 mg/mL of linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -ionone, isoamyl acetate, hexanoic acid, octanoic acid, isobutanol, hexanal, amyl alcohol, isoamyl alcohol, and 1-hexanol; 0.0002 mg/mL of ethyl octanoate, ethyl hexanoate and ethyl decanoate; and  $9.99 \cdot 10^{-5}$  mg/mL of  $\beta$ -damascenone.

### 2.4. Design of experiments (DoE)

A randomised factorial design was used for the two extraction techniques. The software used to perform the DoE was Minitab 18 (Minitab Inc, Pennsylvania, USA).

SBSE. A 5-factor randomised factorial design with 2, 3, 3, 3, and 3 levels each was performed. The factors were: stirring speed (500, and



**Table 1**

Design of experiments with their factors and levels of the two extraction techniques (SBSE and <sup>m</sup>SBSE).

FACTORS		LEVELS		
SBSE	Stirring speed (rpm)	500		1000
	Extraction time (h)	1	3	6
	Extraction temperature (°C)	20, 40, 60		
	Addition of NaCl	YES	NO	Sequential
<sup>m</sup> SBSE	Extraction mode	HS-SBSE	DI-SBSE	HS+DI
	Stirring speed (rpm)	500		1000
	Extraction time (h)	1	3	6
	Extraction temperature (°C)	20, 40, 60		
	Addition of NaCl	YES		NO

1000 rpm), extraction time (1, 3, and 6 h), extraction temperature (20, 40, and 60 °C), NaCl addition (Yes, No, and Sequential), and extraction mode (Head Space (HS), Direct Immersion (DI), and HS+DI) (Table 1). Sequential indicates that NaCl was added at half the extraction time. In order to favor the extraction of less polar compounds at the beginning, and more polar at the end. Samples were run in duplicate, giving a total of 486 assays.

<sup>m</sup>SBSE. A randomised factorial design of 4 factors of 2, 3, 3, and 2 levels each was performed. The factors were: stirring speed (500, and 1000 rpm), extraction time (1, 3, and 6 h), extraction temperature (20, 40, and 60 °C), and NaCl addition (Yes, and No) (Table 1). Samples were run in duplicate, giving a total of 108 assays.

Initially 1500 rpm was tried, but the stirring magnets and Twisters were breaking, so we stopped working at that stirring speed.

**Table 2**

Maximum and minimum values of the relative area with respect to 2-octanol (I.S.) of each compound within each method (SBSE and <sup>m</sup>SBSE).

	SBSE		<sup>m</sup> SBSE	
	maximum value	minimum value	maximum value	minimum value
<b>Terpenoids</b>				
Linalool	7.12 (HS_500_6_20_SEQ)	0.17 (HS_500_3_40_YES)	0.14 (1000_6_20_YES)	0.08 (500_1_60_YES)
α-Terpineol	1.70 (DI_500_6_60_SEQ)	0.01 (HS_500_1_20_YES)	0.11 (500_6_60_NO)	0.03 (1000_1_40_NO)
Geraniol	2.50 (HS+DI_500_6_20_NO)	0.05 (HS_1000_3_40_NO)	0.16 (1000_3_20_NO)	0.04 (1000_1_40_NO)
<b>C<sub>13</sub> norisoprenoids</b>				
β-Damascenone	2.13 (DI_1000_6_60_YES)	0.02 (HS_500_1_20_YES)	0.12 (500_6_60_NO)	0.01 (500_3_20_YES)
β-Ionone	16.35 (DI_1000_1_20_NO)	0.02 (HS_500_6_20_YES)	0.15 (500_6_20_NO)	0.01 (500_3_20_YES)
<b>Benzenoid compounds</b>				
Benzaldehyde	0.22 (HS+DI_500_6_60_YES)	0.004 (HS_500_3_40_YES)	0.03 (500_3_20_NO)	0.002 (1000_1_40_YES)
2-Phenylethanol	0.50 (HS+DI_1000_3_40_NO)	0.01 (HS_500_1_20_YES)	0.04 (1000_6_60_YES)	0.01 (500_1_60_YES)
<b>Esters</b>				
Isoamyl acetate	27.57 (HS_500_6_20_SEQ)	0.12 (DI_1000_6_40_YES)	0.10 (500_3_20_NO)	0.01 (1000_6_60_YES)
Ethyl hexanoate	6.74 (HS_500_6_20_SEQ)	0.06 (DI_1000_6_40_YES)	0.06 (500_3_20_NO)	0.01 (500_6_60_YES)
Ethyl octanoate	2.29 (HS_500_6_20_SEQ)	0.01 (DI_500_1_20_YES)	0.04 (1000_3_20_NO)	0.002 (500_3_20_YES)
Ethyl decanoate	1.85 (HS+DI_1000_3_20_NO)	0.01 (DI_500_1_40_YES)	0.03 (1000_6_20_NO)	0.001 (1000_3_20_YES)
<b>Fatty acids</b>				
Hexanoic acid	4.98 (HS+DI_500_3_60_SEQ)	0.02 (HS_500_6_20_YES)	0.35 (500_3_60_NO)	0.01 (500_3_40_YES)
Octanoic acid	0.89 (DI_500_6_60_SEQ)	0.01 (HS_500_1_20_YES)	0.07 (500_3_20_NO)	0.01 (1000_3_20_NO)
<b>Higher alcohols</b>				
Isoamyl alcohol	1.16 (HS_1000_3_40_NO)	0.01 (HS_500_3_40_YES)	0.01 (500_3_40_NO)	0.0003 (1000_6_60_NO)
Amyl alcohol	0.83 (HS_500_6_20_SEQ)	0.01 (HS_500_3_40_YES)	0.06 (1000_6_20_YES)	0.001 (1000_1_40_NO)
2-Ethyl-1-hexanol	0.81 (DI_1000_3_40_SEQ)	0.01 (HS_1000_3_60_NO)	0.19 (500_1_20_NO)	0.004 (500_1_20_NO)
<b>C6 compounds</b>				
(Z)-3-Hexen-1-ol	1.60 (HS_500_6_20_SEQ)	0.02 (HS_500_3_40_YES)	0.02 (1000_6_60_YES)	0.005 (500_1_20_NO)
Hexanal	33.58 (HS_500_6_20_SEQ)	0.03 (HS_1000_1_40_SEQ)	0.17 (1000_3_20_NO)	0.02 (500_3_20_NO)
1-Hexanol	26.03 (HS_500_6_20_SEQ)	0.32 (HS_500_3_40_YES)	0.45 (500_3_40_NO)	0.06 (1000_1_20_NO)
2-Hexenal	7.85 (HS_500_6_20_SEQ)	0.01 (HS_1000_1_40_SEQ)	0.05 (500_6_20_NO)	0.01 (500_3_40_NO)
2-Hexen-1-ol	6.23 (HS_500_6_20_SEQ)	0.01 (DI_1000_3_40_YES)	0.08 (1000_3_40_YES)	0.01 (500_1_20_NO)
<b>Other compounds</b>				
Decanal	0.86 (HS+DI_500_3_60_NO)	0.004 (HS_500_3_40_YES)	0.10 (500_1_20_NO)	0.002 (1000_1_40_YES)
Furanmethanol			0.09 (500_6_20_NO)	0.0003 (500_1_40_YES)
Acetol			0.09 (500_6_20_NO)	0.003 (1000_6_40_YES)
Methyl jasmonate			14.06 (1000_6_20_YES)	0.08 (1000_6_60_NO)

The conditions that gave these values are shown in parentheses. HS: head-space. DI: direct-immersion. HS+DI: one Twister for HS and one for DI. Stirring speed: 500 or 1000 rpm. Time: 1, 3, 6 h. T<sup>o</sup>: 20, 40, 60 °C. YES: With NaCl. NO: without NaCl. SEQ: NaCl was added halfway through the reaction time.

## 2.5. Conditioning and cleaning of twisters

**SBSE.** The PDMS Twisters were conditioned before the first use and after each use. Stir bars were placed in a desorption tube and thermally desorbed using an autosampler coupled to the gas chromatography (GC) system. These were controlled with GERSTEL MAESTRO software. Stir bars were thermally desorbed using helium as carrier gas at a flow rate of 75 mL/min; TDU was programmed from 40 °C to 300 °C (45 min) at a rate of 100 °C/min for following the supplier's recommendations. The temperature of the CIS-4 was 300 °C (5 min), which was reached at a rate of 12 °C/s.

**<sup>m</sup>SBSE.** EG Twisters were conditioned before the first use and after each use. Stir bars were thermally desorbed using helium as carrier gas at a flow rate of 75 mL/min; the TDU temperature programme was as follows: 40 °C to 240 °C (30 min) at a rate of 100 °C/min for following the supplier's recommendations. The CIS-4 temperature was programmed to reach 240 °C (5 min) at 12 °C/s. The GC oven temperature was programmed at 40 °C (5 min), raised to 170 °C (2 °C/min, held for 0 min) then to 220 °C (10 °C/min, held 15 min).

## 2.6. Optimization of volatile compounds extraction

### 2.6.1. Stir bar sorptive extraction (SBSE)

Different amounts of sample were added depending on the extraction mode (HS or DI). This is due to the fact that, when working with grape must, and the PDMS Twister works by DI, the sample has to be diluted so that no remains of sugars adhere to it.

**Head Space SBSE (HS-SBSE).** An aliquot of 8 mL of centrifuged must sample (15 min, 4500 rpm), 1 mL of the standards solution, and 25 µL of the 2-octanol solution (5 µL 2-octanol/100 mL EtOH) were added to a



**Table 3**  
Variables (compounds) of each principal component (PC) for each method (SBSE and <sup>m</sup>SBSE).

PC	SBSE	<sup>m</sup> SBSE
1	(Z)-3-Hexen-1-ol (0.97)	Ethyl hexanoate (0.96)
	Isoamyl acetate (0.95)	Ethyl octanoate (0.95)
	Amyl alcohol (0.94)	Isoamyl acetate (0.93)
	Hexanal (0.93)	β-Ionone (0.81)
	2-Hexenal (0.92)	Ethyl decanoate (0.77)
	2-Hexen-1-ol (0.91)	α-Terpineol (-0.76)
	1-Hexanol (0.88)	Benzaldehyde (0.72)
	Ethyl hexanoate (0.86)	2-Hexenal (0.70)
	Linalool (0.70)	
2	α-Terpineol (0.93)	1-Hexanol (0.87)
	Octanoic acid (0.90)	2-Hexen-1-ol (0.86)
	2-Phenylethanol (0.79)	Isoamyl alcohol (0.67)
	Geraniol (0.74)	(Z)-3-Hexen-1-ol (0.64)
	2-Ethyl-1-hexanol (0.73)	Hexanal (-0.55)
3	Ethyl decanoate (0.94)	Octanoic acid (0.90)
	β-Ionone (0.93)	2-Phenylethanol (0.67)
	Ethyl octanoate (0.75)	(E)-β-Damascenone (0.61)
4	Decanal (0.84)	Decanal (0.73)
	Benzaldehyde (0.78)	Hexanoic acid (0.56)
	(E)-β-Damascenone (0.63)	
5	Hexanoic acid (0.83)	Furanmethanol (0.80)
	Isoamyl alcohol (0.62)	Linalool (0.68)
6	-	Acetol (0.66)
	-	Amyl alcohol (0.77)
7	-	Methyl jasmonate (0.82)
	-	2-Ethyl-1-hexanol (0.61)

The percentage weight of each variable within each component is shown in parentheses.

20 mL extraction vial. If NaCl had to be added, 2.5 g was added. Compounds were extracted by introducing the PDMS coated stir bar into a insert for headspace, and this insert was put into the 20 mL vial. A borosilicate magnetic stirrer was added.

**Direct immersion SBSE (DI-SBSE).** An aliquot of 0.8 mL of centrifuged must sample (15 min, 4500 rpm), 0.1 mL of the standards solution, 25 µL of the 2-octanol solution (5 µL 2-octanol/100 mL EtOH), and 8.1 mL of Milli-Q water were added in a 20 mL vial. If NaCl had to be added, 2.5 g was added. Compounds were extracted by introducing the PDMS coated stir bar into 20 mL vial. Twister works as a stirrer.

All samples were stirred at the working speed (500, or 1000 rpm), at the specified time (1, 3, or 6 h) and at the definite temperature (20, 40, or 60 °C). At the end of the extraction time, the stir bar was removed from the sample, rinsed with distilled water and dried with a tissue paper, and later transferred into a thermal desorption tube for GC-MS analysis. The TDU tube was sealed with a transport adapter and placed in a 40 position Twister rack on the MPS robotic for automated analysis.

#### 2.6.2. Multi-stir bar sorptive extraction (<sup>m</sup>SBSE)

In this case, DI was always used, since the PDMS Twister is always submerged. A 0.8 mL aliquot of centrifuged sample (15 min, 4500 rpm), 0.1 mL of the standards solution, 25 µL of the 2-octanol solution (5 µL 2-octanol/100 mL EtOH), and 8.1 mL of Milli-Q water were added in a 20 mL vial. If NaCl had to be added, 2.5 g was added. Compounds were extracted by introducing the PDMS coated stir bar (0.5 mm film thickness, 10 mm length) into the 20 mL vial, and the EG coated stir bar (10 mm length, 32 µL phase volume) into de insert for headspace 20 mL vial. The Twister works as a stirrer.

All samples were stirred at the working speed (500, or 1000 rpm), at the specified time (1, 3, or 6 h) and at the specified temperature (20, 40, or 60 °C). At the end of the extraction time, the stir bars were then removed from the sample, rinsed with distilled water and dried with a cellulose tissue, and later transferred into a thermal desorption tube for GC-MS analysis. The TDU tube was sealed with a transport adapter and placed in a 40 position Twister rack on the MPS robotic for automated

analysis.

#### 2.7. Desorption conditions

The volatile analysis was performed using an automated TDU. The method used for the determination of must volatile composition is based on that described by Sánchez-Gómez, Zalacain, Alonso, and Salinas (2014) with some modifications.

**SBSE.** Stir bars, coating with PDMS, were thermally desorbed using helium as carrier gas at a flow rate of 75 mL/min; TDU was programmed from 40 °C to 295 °C (5 min) at a rate of 60 °C/min for following the supplier's recommendations. The analytes were focused on the CIS-4, containing a packed liner (20 mg of Tenax), at -40 °C with liquid N<sub>2</sub> cooling prior to injection. After desorption and focusing, the CIS-4 temperature was programmed to reach 260 °C (5 min) at 12 °C/s to transfer volatiles onto the analytical column. The TDU operated in the splitless desorption mode, the CIS-4 operated in PTV solvent vent mode (purge flow to split vent of 80 mL/min, vent 75 mL/min and pressure 20.85 psi).

**<sup>m</sup>SBSE.** Stir bars were thermally desorbed using helium as carrier gas at a flow rate of 75 mL/min; the desorption was carried out with the following TDU temperature program: beginning at 40 °C, increased to 200 °C at 60 °C/min and held at 200 °C for 5 min. Desorbed compounds were then transferred to the CIS-4 system, and cryo-focused at -40 °C on a Tenax TA-packed liner (20 mg of Tenax). After desorption and focusing, the CIS-4 inlet was programmed to increase to 230 °C at 12 °C/s from the initial temperature of -40 °C and held at 230 °C for 5 min to transfer volatiles onto the analytical column. The TDU operated in the splitless desorption mode, the CIS-4 operated in PTV solvent vent mode (purge flow to split vent of 80 mL/min, vent 75 mL/min and pressure 20.85 psi).

#### 2.8. Chromatographic conditions

The desorbed volatile compounds were separated in an Agilent 7890A gas chromatograph system (GC) coupled to a triple quadrupole (QqQ) Agilent 7000C electron ionization mass spectrometric detector (Agilent Technologies), operating in simple quadrupole (Q).

The GC oven temperature was programmed at 40 °C (2 min), raised to 80 °C (5 °C/min, held for 2 min), then to 130 °C (10 °C/min, held 5 min), then to 150 °C (5 °C/min, held for 5 min) and finally to 230 °C (10 °C/min, held 5 min). The MS operated in scan mode (35–300 amu) with ionization energy set at 70 eV. The temperature of the MS transfer line was 230 °C. Each molecule was identified by comparing mass spectrum with those of the NIST library and chromatographic retention index of each standard. Compounds for which no standard was added were identified by comparing their mass spectra with NIST. To avoid matrix interferences, the GC peak area of each compound was obtained from the ion extraction chromatogram (EIC) by selecting target ions for each one. The target ions were *m/z* 41 for 2-hexenal, *m/z* 43 for isoamyl acetate, decanal, and acetol, *m/z* 45 for 2-octanol (I.S.), *m/z* 55 for isoamyl alcohol, *m/z* 56 for 1-hexanol, and hexanal, *m/z* 57 for amyl alcohol, 2-ethyl-1-hexanol, and (E)-2-hexen-1-ol, *m/z* 59 for α-terpineol, *m/z* 60 for hexanoic acid, and octanoic acid, *m/z* 67 for (Z)-3-hexen-1-ol, *m/z* 69 for β-damascenone, and geraniol, *m/z* 71 for linalool, *m/z* 77 for benzaldehyde, *m/z* 83 for methyl jasmonate, *m/z* 88 for ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate, *m/z* 91 for 2-phenylethanol, *m/z* 98 for furanmethanol, and *m/z* 177 for β-ionone. Finally, a semi-quantification was carried out by comparing the area of each compound with that of 2-octanol (I.S.), thus obtaining the relative area.

#### 2.9. Statistical analysis

In accordance with the objective of maximizing the overall extraction of volatiles, a statistical analysis has been proposed in which the values of relative area of all the volatile compounds obtained in each of



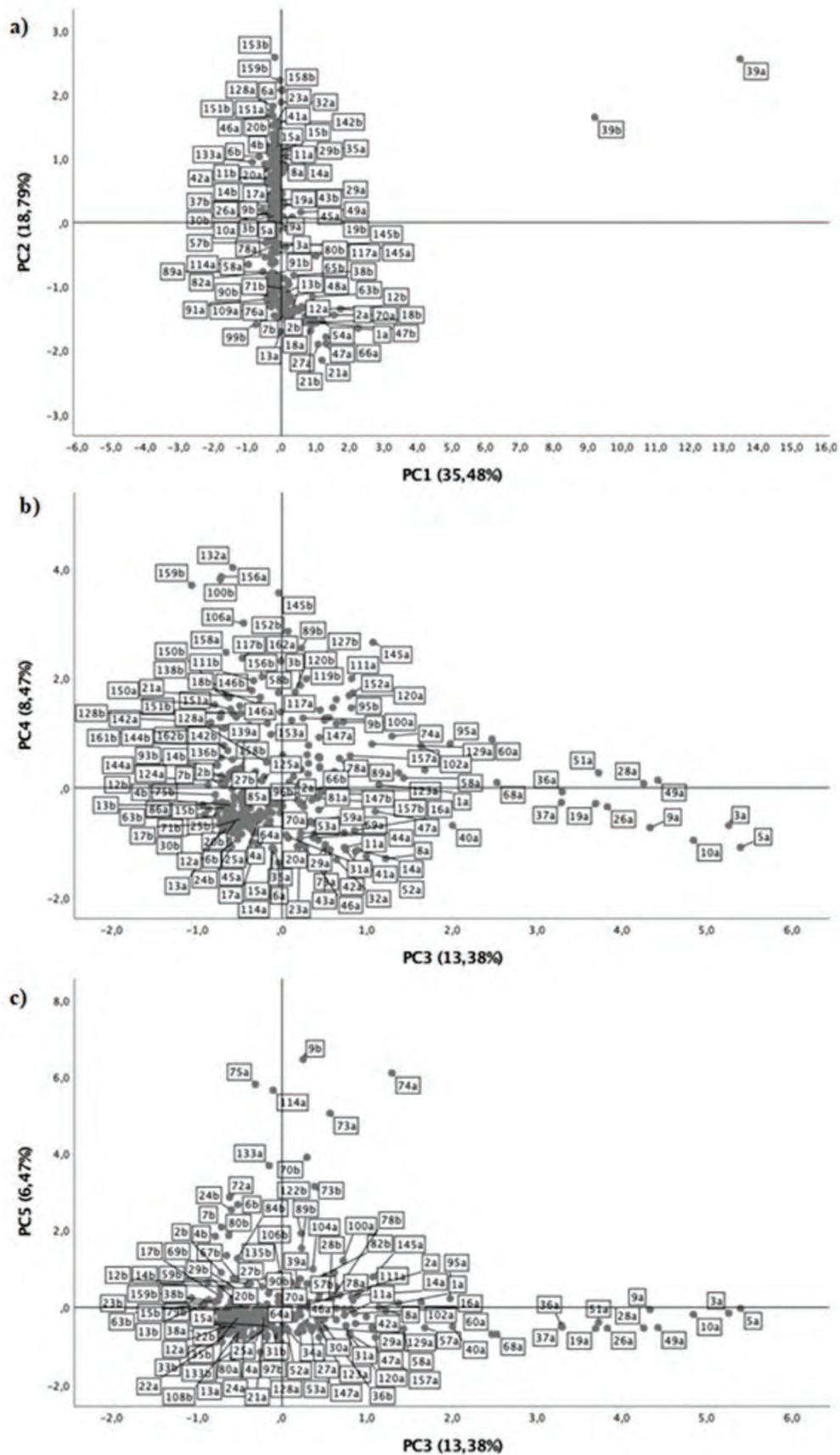
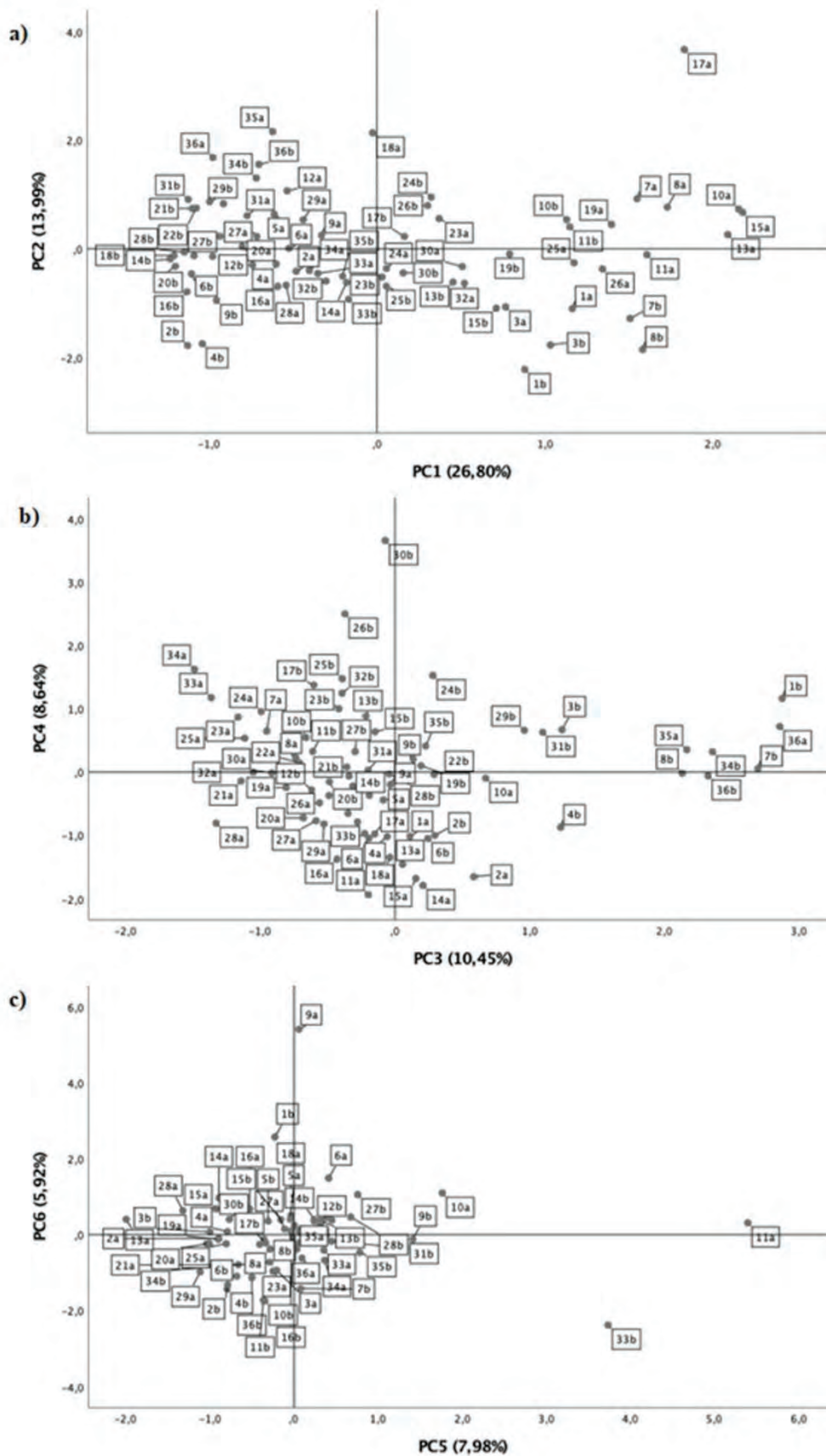


Fig. 1. Principal component analysis plots for SBSE method. a) PC1 vs PC2, b) PC3 vs PC4, and c) PC5 vs PC6. Each number shown in the graphic corresponds to a combination of conditions. The letters "a" and "b" after each number correspond to the two replicates of each combination of conditions.

## 4. RESULTADOS



**Fig. 2.** Principal component analysis plots for  $^{13}\text{C}$ SBSE method. a) PC1 vs PC2, b) PC3 vs PC4, and c) PC5 vs PC6. Each number shown in the graphic corresponds to a combination of conditions. The letters “a” and “b” after each number correspond to the two replicates of each combination of conditions.



Table 4

Tests of inter-subject effects obtained from multifactorial analysis of variance (ANOVA) for <sup>m</sup>SBSE.

	PC Factors	1		2		3		4		5	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Simples	RPM	0.120	0.731	0.002	0.962	0.003	0.958	0.145	0.705	0.004	0.952
	Time	1.872	0.168	8.351	<b>0.001*</b>	0.056	0.946	2.024	0.147	5.785	<b>0.007*</b>
	T <sup>a</sup>	8.418	<b>0.001*</b>	4.01	<b>0.027*</b>	2.586	0.089	4.566	<b>0.017*</b>	1.031	0.367
	NaCl	181.815	<b>0.000*</b>	1.231	0.275	0.148	0.702	8.913	<b>0.005*</b>	0.921	0.344
Second-order interactions	RPM*time	0.075	0.928	0.537	0.589	0.014	0.986	0.276	0.761	0.094	0.911
	RPM*T <sup>a</sup>	0.029	0.971	0.095	0.910	0.015	0.985	0.714	0.497	0.497	0.613
	RPM*NaCl	0.001	0.976	1.858	0.181	2.172	0.149	0.03	0.863	0.001	0.980
	Time*T <sup>a</sup>	2.448	0.064	1.043	0.398	3.405	<b>0.018*</b>	0.871	0.491	1.025	0.408
	Time*NaCl	2.485	0.098	0.244	0.784	0.735	0.487	1.372	0.267	1.474	0.242
	T <sup>a</sup> *NaCl	7.331	<b>0.002*</b>	1.507	0.235	2.442	0.101	0.026	0.975	0.608	0.550

\*Indicates significant effect of simple factor or second-order interaction ( $p < 0.05$ ).

the described experimental conditions are studied simultaneously. Before approaching this analysis, an exhaustive descriptive analysis was carried out which allowed the detection and elimination of outliers, when necessary. In this analysis, the significant correlation between volatile compounds has also been verified, which justifies the need to analyze all the values of the volatiles using a multivariate treatment.

For the collective study of volatile compounds, a principal component analysis (PCA) was performed to reduce the dimensionality of the problem by synthesizing the initial data vectors into a reduced number of principal components (PCs) (James, Witten, Hastie, & Tibshirani, 2013). In order to facilitate the interpretation of the PC obtained, a varimax rotation was applied. For this purpose, and in coherence with the experimental design described above, a multifactorial analysis of variance (ANOVA) was used, taking the scores of each PC as the response variable.

Finally, another ANOVA was performed to compare the best conditions of the two methods (SBSE, and <sup>m</sup>SBSE). In this case, the volatile compounds were not treated as a set, but the relative area values of each were compared individually.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Must volatile composition

The maximum and minimum values of relative area obtained for each volatile compound with each of the methods can be seen in Table 2. Due to the large amount of data obtained, only the conditions that provided the maximum and minimum value for each compound are shown. The compounds listed in Table 2 are all those that could be identified in the chromatogram, regardless of whether standard was added or not.

A total of 22 compounds were identified for SBSE, and 25 for <sup>m</sup>SBSE. The terpenoids identified were: linalool,  $\alpha$ -terpineol, and geraniol. The C<sub>13</sub> norisoprenoids identified were  $\beta$ -damascenone, and  $\beta$ -ionone. The benzenoid compounds identified were: benzaldehyde, and 2-phenylethanol. Terpenoids, C<sub>13</sub> norisoprenoids, and some benzenoid compounds are the most important grape aroma compounds present in the pulp and skin of the berries in both free and glycoside forms (Gutiérrez-Gamboa, Pérez-Álvarez, Rubio-Bretón, & Garde-Cerdán, 2019). Terpenes are the constituents responsible for the characteristic floral and fragrant Muscat aroma in grapes and wines (Marín-San Román, Garde-Cerdán, et al., 2020).

In addition, 4 esters were identified: isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate, 2 fatty acids: hexanoic acid, and octanoic acid, and 3 higher alcohols: isoamyl alcohol, amyl alcohol, and 2-ethyl-1-hexanol. The ethyl esters contribute to the pleasant aroma (Rubio-Bretón et al., 2019).

Five C<sub>6</sub> compounds were also identified: (Z)-3-hexen-1-ol, hexanal, 1-hexanol, 2-hexenal, and 2-hexen-1-ol. C<sub>6</sub> compounds, which are referred to as "green leaf volatiles," are characterized by a "herbaceous"

and "green" aroma (Rubio-Bretón et al., 2019).

Finally, other compounds were identified, in the case of SBSE, decanal, and in the case of <sup>m</sup>SBSE, decanal, furanmethanol, acetol, and methyl jasmonate. These compounds are not of special relevance to grape aroma.

SBSE. It can be seen in Table 2 that many of the compounds maximized their extraction with the same conditions (HS\_500 rpm\_6h\_20 °C\_Secuencia). Subsequently, the necessary statistics were performed to confirm these results.

<sup>m</sup>SBSE. In view of the results presented in Table 2, it was not possible to choose conditions that would maximize the extraction of most of the compounds, in contrast to what occurred in SBSE. Therefore, in order to determine these conditions, it was necessary to use a multivariate statistical analysis.

Table 2 shows that the maximum values for the SBSE method were much higher than those for the <sup>m</sup>SBSE method. This result was contrary to expectations, since the objective of using the <sup>m</sup>SBSE was to improve the extraction of the more polar compounds, without affecting the extraction of the less polar ones (Serrano de la Hoz et al., 2016; Tang et al., 2020).

#### 3.2. Principal component Analysis (PCA)

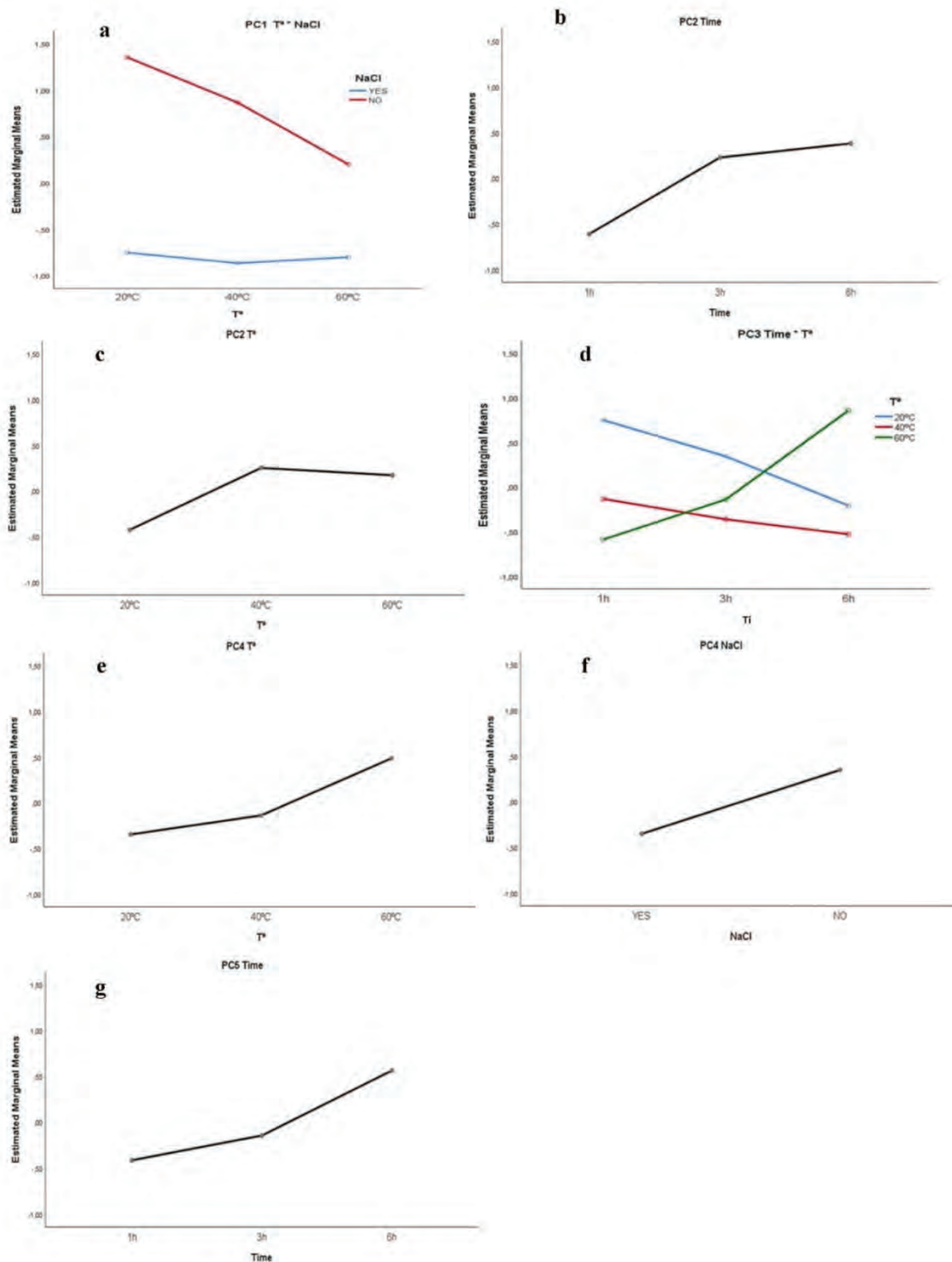
A PCA was performed to reduce the total number of variables (compounds) to a reduced number of principal components (PCs). The number of variables used was 22 (SBSE), and 25 (<sup>m</sup>SBSE) (Table 2). In all cases it was found that the Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) test of sampling adequacy obtained sufficiently large values (between 0 and 1): in all cases values above 0.8 were obtained (Hair, Anderson, Black, & Babin, 2010). Bartlett's test of sphericity was also significant in all cases. Both tests indicate that the underlying PC extraction method is adequate. The values of the communalities of each of the variables were high in all cases. This analysis has allowed us to identify groups of volatile compounds with correlated performance, which has simplified the study of the relationship between the values obtained in the aromatic profile with the experimental factors.

Table 3 shows the number of resulting PCs for each method, as well as the variables that form each PC, and the weights of each one of them.

SBSE. Five PCs were retained, with an overall retained variance of 82.96%. The compounds with highest weight in each PC were: PC1: (Z)-3-Hexen-1-ol, isoamyl acetate, amyl alcohol, hexanal, 2-hexenal, 2-hexen-1-ol, 1-hexanol, ethyl hexanoate, and linalool, which are divided into: 5 C<sub>6</sub> compounds, 2 esters, 1 higher alcohol, and 1 terpenoid. PC2:  $\alpha$ -terpineol, octanoic acid, 2-phenylethanol, geraniol, and 2-ethyl-1-hexanol, which are divided into: 2 terpenoids, 1 fatty acid, 1 benzenoid, and 1 higher alcohol. PC3: ethyl decanoate,  $\beta$ -ionone, y ethyl octanoate, which are divided into: 2 esters, and 1 C<sub>13</sub> norisoprenoid. PC4: decanal, benzaldehyde, and  $\beta$ -damascenone, which are divided into: 1 aldehyde, 1 benzenoid, and 1 C<sub>13</sub> norisoprenoid. Finally, PC5: hexanoic acid, and isoamyl alcohol, i.e., 1 ester and 1 higher alcohol, respectively.



## 4. RESULTADOS



**Fig. 3.** Plots of estimated marginal means for <sup>13</sup>C-SBSE method. a) T\*<sup>th</sup>\*NaCl interaction for PC1, b) Time factor for PC2, c) Temperature factor for PC2, d) Time\*<sup>th</sup> interaction for PC3, e) Temperature factor for PC4, f) NaCl factor for PC4, and g) Time factor for PC5.

Fig. 1 shows the plots of the sample scores on the PCA for the SBSE method. Fig. 1a shows the PCA for PC1 and PC2. PC1 explained a variance of 35.48%, and PC2 18.79%. In this case it was clearly observed that samples 39a and 39b (replicates), maximized the response of the volatile compounds belonging to PC1 and PC2. The conditions corresponding to these samples are: head space, 500 rpm, 6 h, 20 °C, and NaCl sequential addition (HS\_500\_6\_20\_SEQ). This confirmed what was observed in Table 2.

Since a randomized factorial design was followed, these samples, despite being two replicates of the same conditions, were performed on different days, which confirmed that the HS\_500\_6\_20\_SEQ conditions were the best for extracting the volatile compounds belonging to PC1 and PC2. Fig. 1b shows the PCA plots for PC3, PC4 and PC4. PC3 explained a variance of 13.38%, and PC4 explained a variance of 8.47%. Fig. 1c shows the plots of the PCA for PC3 and PC5. PC5 explained a variance of 6.47%. For the compounds belonging to these PCs, no pair of



**Table 5**

Best conditions within each principal component chosen from inter-subject tests and plots of estimated marginal means, and global conditions for <sup>m</sup>SBSE.

PC	Compounds	Best conditions	Optimal conditions
1	Ethyl hexanoate	20°C-No NaCl > >40°C-No NaCl > >60°C-No NaCl	500_6_60_NO
	Ethyl octanoate		
	Isoamyl acetate		
	β-Ionone		
	Ethyl decanoate		
	α-Terpineol		
	Benzaldehyde		
2	1-Hexanol	6h 40°C ≈ 60°C	500_6_60_NO
	2-Hexen 1-ol		
	Isoamyl alcohol		
	(Z)-3-Hexen-1-ol		
	Hexanal		
3	Octanoic acid	6h-60°C	500_6_60_NO
	2-Phenylethanol		
	(E)-β-Damascenone		
4	Decanal	60°C No NaCl	500_6_60_NO
	Hexanoic acid		
5	Furanmethanol	6h	500_6_60_NO
	Linalool		
	Acetol		
6	Amyl alcohol	a	500_6_60_NO
7	Methyl jasmonate	a	500_6_60_NO
	2-Ethyl-1-hexanol		

Stirring speed: 500 or 1000 rpm. Time: 1, 3, 6 h. T<sup>a</sup>: 20, 40, 60 °C. YES: With NaCl. NO: without NaCl. <sup>a</sup>Indicates that no significant factors or interactions exist for these principal components.

conditions was observed that clearly differed from the rest. For this reason, and since in Fig. 1a the differences were so clear, the conditions chosen for the SBSE method were HS\_500\_6\_20\_SEQ, so it was not necessary to perform ANOVA.

<sup>m</sup>SBSE. A total of 7 PC were retained, with an overall retained variance of 73.78%. The compounds with the highest weight in PC1 were: ethyl hexanoate, ethyl octanoate, isoamyl acetate, β-ionone, ethyl decanoate, α-terpineol, and benzaldehyde, which were divided into: 4 esters, 1 C<sub>13</sub> norisoprenoid, 1 terpenoid, 1 benzenoid, and 1 C6 compound. PC2: 1-hexanol, 2-hexen 1-ol, isoamyl alcohol, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanal, and 2-hexenal, which were divided into: 4 C6 compounds, and 1 higher alcohol. PC3: the fatty acid, octanoic acid, the benzenoid, 2-phenylethanol, and the C<sub>13</sub> norisoprenoid, β-damascenone. PC4: the other compound, decanal, and the fatty acid, hexanoic acid. PC5: furanmethanol, linalool, and acetol, which were divided into 2 other compounds, and 1 terpenoid. PC6: the higher alcohol, amyl alcohol. PC7: the other compounds, methyl jasmonate, and the higher alcohol, 2-ethyl-1-hexanol.

Fig. 2 shows the PCA corresponding to the <sup>m</sup>SBSE method. Fig. 2a shows the PCA of PC1 and PC2. PC1 explained a variance of 26.80%, and PC2 explained a variance of 13.99%. Fig. 2b shows the PCA of PC3 and PC4. PC3 explained a variance of 10.45%, and PC4 explained a variance of 8.64%. Fig. 2c shows the PCA of PC5 and PC6. PC5 explained a variance of 7.98%, and PC6 explained a variance of 5.92%. In this case, no graph showed the existence of a pair of conditions that clearly differed from the rest, for which ANOVA was used.

### 3.3. Selection of optimal conditions for <sup>m</sup>SBSE

The selection of the conditions that optimized the extraction of volatile compounds in <sup>m</sup>SBSE was performed with an ANOVA. It was verified that all the parametric hypotheses necessary for the use of this technique were satisfied. Table 4 shows the results of the test of inter-

**Table 6**

Values of relative area with respect 2-octanol (I.S) obtained with the global conditions of the two methods (SBSE and <sup>m</sup>SBSE) for each of the compounds.

	SBSE	<sup>m</sup> SBSE	p
Terpenoids			
Linalool	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.72
α-Terpineol	<b>0.23 ± 0.03</b>	0.11 ± 0.04	<b>0.01*</b>
Geraniol	<b>0.69 ± 0.01</b>	0.13 ± 0.00	<b>0.00*</b>
C <sub>13</sub> norisoprenoids			
β-Damascenone	<b>0.17 ± 0.02</b>	0.11 ± 0.01	<b>0.01*</b>
β-Ionone	<b>0.03 ± 0.00</b>	0.00 ± 0.00	<b>0.00*</b>
Benzenoid compounds			
Benzaldehyde	<b>0.72 ± 0.05</b>	0.04 ± 0.01	<b>0.00*</b>
2-Phenylethanol	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.00	0.08
Esters			
Isoamyl acetate	<b>2.32 ± 0.24</b>	0.07 ± 0.01	<b>0.00*</b>
Ethyl hexanoate	<b>0.32 ± 0.01</b>	0.09 ± 0.01	<b>0.00*</b>
Ethyl octanoate	0.07 ± 0.01	<b>0.12 ± 0.00</b>	<b>0.00*</b>
Ethyl decanoate	<b>0.05 ± 0.01</b>	0.02 ± 0.00	<b>0.01*</b>
Fatty acids			
Octanoic acid	<b>0.09 ± 0.01</b>	0.01 ± 0.00	<b>0.00*</b>
Hexanoic acid	<b>0.15 ± 0.04</b>	0.07 ± 0.01	<b>0.03*</b>
Higher alcohols			
Isoamyl alcohol	<b>1.79 ± 0.16</b>	0.23 ± 0.17	<b>0.00*</b>
Amyl alcohol	<b>0.28 ± 0.05</b>	0.02 ± 0.00	<b>0.00*</b>
2-Ethyl-1-hexanol	<b>0.15 ± 0.01</b>	0.07 ± 0.01	<b>0.00*</b>
C6 compounds			
(Z)-3-Hexen-1-ol	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.37
Hexanal	<b>1.71 ± 0.56</b>	0.08 ± 0.00	<b>0.01*</b>
1-Hexanol	<b>0.07 ± 0.01</b>	0.00 ± 0.00	<b>0.00*</b>
2-Hexenal	<b>0.10 ± 0.04</b>	0.03 ± 0.01	<b>0.04*</b>
2-Hexen-1-ol	<b>0.04 ± 0.01</b>	0.02 ± 0.00	<b>0.02*</b>
Other compounds			
Decanal	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.69
Furanmethanol	0.22 ± 0.00	<b>0.69 ± 0.08</b>	<b>0.00*</b>
Acetol	0.27 ± 0.14	0.05 ± 0.02	0.07

Data are shown as mean ± standard deviation (n = 3). \*Indicate significant differences between methods (p ≤ 0.05). Bold indicates the highest value of the compound showing significant differences.

subject effects, showing the F value as well as the p for each PC.

Table 4 shows that, for PC1, the factors T<sup>a</sup> and NaCl were significant, as well as the interaction T<sup>a</sup>\*NaCl. For PC2, the factors time and T<sup>a</sup> had a significant effect. In the case of PC3, the interaction time\*T<sup>a</sup> was significant. In PC4, the factors T<sup>a</sup> and NaCl were significant. Finally, for PC5, the time factor had a significant effect. In the case of PC6 and PC7, neither factor or interaction was significant.

Once the factors or interactions that have a significant effect for each PC are known, we look at the plots of marginal means of these factors (Fig. 3).

Fig. 3 shows the plots of marginal means of the factors and interactions that have a significant effect, obtained in the ANOVA of the <sup>m</sup>SBSE method. Fig. 3a shows the graph of the T<sup>a</sup>\*NaCl interaction for PC1. It was observed that the best results were obtained at 20 °C and without adding NaCl, followed by 40 °C without NaCl, and followed by 60 °C without NaCl. Fig. 3b and c shows the graphs of the individual factors time and T<sup>a</sup> for PC2. In this case, the best results were 6h, and 40 °C or 60 °C. Fig. 3d shows the graph of the time\*T<sup>a</sup> interaction for PC3. The combination of conditions that provided a higher extraction of the volatile compounds belonging to this group were 6h and 60 °C. Fig. 3e and f represent the T<sup>a</sup> and NaCl factors respectively for PC4. The T<sup>a</sup> value that provided the highest extraction for PC4 compounds was 60 °C. Besides, the highest values for the compounds belonging to the PC4 group were obtained when NaCl was not added. Finally, Fig. 3g shows the time factor graph for PC5. In this case the value of this factor that optimized the extraction of the compounds forming PC5 was 6h.

Table 5 shows the best conditions within each PC, as well as the optimal conditions finally chosen.

Once the best conditions were chosen for each PC, a compromise situation was reached, in order to find a global maximization. In this



case it was simple since in most of the PCs the best conditions were 6h, 60 °C, and without NaCl. Therefore, in the case of PC1, the third option was chosen instead of the first one. However, in Fig. 3a it can be seen how despite being the third option, this combination of conditions still gives a great response compared to the samples that carried NaCl, regardless of the T<sup>a</sup>. Thus, this choice did not greatly compromise the extraction of compounds belonging to this PC, which remained high. The optimum conditions chosen for this method were: 500 rpm, 6h, 60 °C, without NaCl (500\_6\_60\_NO) (Table 5). Since rpm was not a significant factor in any PC, 500 rpm was chosen as it is less aggressive to the magnets.

#### 3.4. Comparison of SBSE and <sup>13</sup>SBSE optimal conditions

Finally, a comparison was made between the optimal conditions chosen for SBSE and the optimal conditions chosen for <sup>13</sup>SBSE. For this, 3 replicates were prepared with the SBSE method, by HS, at 500 rpm, for 6h, at 20 °C, adding NaCl at half time, and 3 replicates with the <sup>13</sup>SBSE method, adding the PDMS Twister by DI, the EG Twister by HS, at 500 rpm, for 6h, at 60 °C, without NaCl.

The results of this comparison are shown in Table 6, which shows the means of the relative area results obtained for each compound, as well as their standard deviation (n = 3). The optimum conditions chosen for SBSE provide better extractions of α-terpineol, geraniol, β-damascenone, β-ionone, benzaldehyde, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl decanoate, octanoic acid, hexanoic acid, isoamyl alcohol, Amyl alcohol, 2-ethyl-1-hexanol, hexanal, 1-hexanol, 2-hexenal, and 2-hexen-1-ol. On the other hand, <sup>13</sup>SBSE better extracts ethyl octanoate, and furanmethanol. Therefore, it can be concluded that the SBSE provides a higher extraction of volatile compounds than <sup>13</sup>SBSE, under the conditions: head space (HS), 500 rpm, 6 h, 20 °C, and NaCl sequential addition (HS\_500\_6\_20\_SEQ).

#### 4. Conclusions

For the first time for these techniques, so many factors with so many different conditions are optimized. It can be concluded that both methods (SBSE and <sup>13</sup>SBSE) generally provide good extraction of volatile compounds in must. The combination of principal component analysis (PCA) with multifactorial analysis of variance (ANOVA) was used to choose the best conditions for each method, being, for SBSE: Head-space (HS), stirring at 500 rpm for 6 h at 20 °C, and adding NaCl at 3 h of extraction (HS\_500\_6\_20\_SEQ). For <sup>13</sup>SBSE: stirring at 500 rpm for 6 h at 60 °C, without adding NaCl (500\_6\_60\_NO). Finally, the comparison between the optimal conditions of each method confirmed that the best method for the extraction of volatile compounds in must is the classical SBSE, using only the PDMS Twister.

#### CRedit authorship contribution statement

**Sandra Marín-San Román:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft. **José Miguel Carot-Sierra:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Itziar Sáenz de Urturi:** Investigation, Writing – review & editing. **Pilar Rubio-Bretón:** Investigation, Writing – review & editing. **Eva P. Pérez-Álvarez:** Investigation, Writing – review & editing. **Teresa Garde-Cerdán:** Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing – review & editing.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Data availability

Data will be made available on request.

#### Acknowledgments

Financial support was given by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades under the project RTI2018-096549-B-I00. S. M.-S.-R. thanks Gobierno de La Rioja for her predoctoral contract. E. P. P.-Á. thanks the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades for her postdoctoral contract.

#### References

- Alexandre-Tudo, J. L., Weightman, C., Panzeri, V., Nieuwoudt, H. H., & Du Toit, W. J. (2015). Effect of skin contact before and during alcoholic fermentation on the chemical and sensory profile of South African Chenin Blanc white wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 366–377. <https://doi.org/10.21548/36-3-969>
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy Cancellieri, V., & Cerdà, V. (2016). Solid phase extraction of organic compounds: A critical review. Part ii. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 80, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>
- Baltussen, E., Cramers, C., & Sandra, P. (2002). Sorptive sample preparation - a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(1–2), 3–22. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1266-2>
- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737–747. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4)
- Berrou, K., Dunyach-Remy, C., Lavigne, J. P., Roig, B., & Cadieere, A. (2019). Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites. *Talanta*, 195, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.042>
- Bicchi, C., Iori, C., Rubiolo, P., & Sandra, P. (2002). Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 449–459. <https://doi.org/10.1021/jf010877x>
- Black, C. A., Parker, M., Siebert, T. E., Capone, D. L., & Francis, I. L. (2015). Terpenoids and their role in wine flavour: Recent advances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 582–600. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12186>
- Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P., & Hernández-Córdoba, M. (2013). Stir bar sorptive extraction with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol isomers in wines. *Journal of Chromatography A*, 1315, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.045>
- Carlomagno, A., Schubert, A., & Ferrandino, A. (2016). Screening and evolution of volatile compounds during ripening of 'Nebbiolo', 'Dolcetto' and 'Barbera' (*Vitis vinifera* L.) neutral grapes by SBSE-GC/MS. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2626-4>
- Caven Quattrill, D. J., & Buglass, A. J. (2006). Comparison of micro-scale simultaneous distillation-extraction and stir bar sorptive extraction for the determination of volatile organic constituents of grape juice. *Journal of Chromatography A*, 1117(2), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.091>
- Caven Quattrill, D. J., & Buglass, A. J. (2011). Comparison of volatile constituents extracted from model grape juice and model wine by stir bar sorptive extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(7), 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.078>
- Doneva-Sapceska, D., Sponholz, W. R., & Tasev, I. (2011). Analysis of volatile components in Riesling wines with and without enzyme treatment by SBSE-GC/MS technique. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46(4), 409–418. <https://doi.org/10.4324/9781849776615>
- Fang, Y. L., & Qian, M. C. (2006). Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot Noir wines from different grape maturities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8567–8573. <https://doi.org/10.1021/jf061396m>
- Franc, C., David, F., & de Revel, G. (2009). Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3318–3327. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.103>
- Gómez-Caballero, A., Goicolea, M. A., Unceta, N., Sampedro, M. C., Sanchez-Ortega, A., Barrio, R. J., et al. (2013). Characterisation of the flavour profile from Graciano *Vitis vinifera* wine variety by a novel dual stir bar sorptive extraction methodology coupled to thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 777, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.024>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Pérez-Álvarez, E. P., Rubio-Bretón, P., & Garde-Cerdán, T. (2019). Changes on grape volatile composition through elicitation with methyl jasmonate, chitosan, and a yeast extract in Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Scientia Horticulturae*, 244, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.063>. May 2018.
- Hair, J. F., Anderson, R. E., Black, W. C., & Babin, B. J. (2010). *Multivariate data analysis* (7th ed.). John Wiley & Sons.
- Huang, Y., Liew, C. S. M., Goh, S. X. L., Goh, R. M. V., Ee, K. H., Pua, A., et al. (2020). Enhanced extraction using a combination of stir bar sorptive extraction and thin



- film-solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1633, Article 461617. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461617>
- James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2013). *An introduction to statistical learning with applications in R* (1st ed. 20). New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7138-7>
- Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1–2), 35–62. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00309-5)
- Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C., Grossi, P., & Olivares, I. R. B. (2009). Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *Journal of Separation Science*, 32(5–6), 813–824. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800669>
- Marín-San Román, S., Garde-Cerdán, T., Baroja, E., Rubio-Bretón, P., & Pérez-Álvarez, E. P. (2020). Foliar application of phenylalanine plus methyl jasmonate as a tool to improve Grenache grape aromatic composition. *Scientia Horticulturae*, 272 (January), Article 109515. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109515>
- Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2020). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*, 137(September), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>
- Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2005). Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of Chromatography A*, 1098(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.126>
- Marrufo-Curtido, A., Cejudo-Bastante, M. J., Durán-Guerrero, E., Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., Chinnici, F., et al. (2012). Characterization and differentiation of high quality vinegars by stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS). *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.028>
- Martínez-Gil, A. M., Garde-Cerdán, T., Martínez, L., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2011). Effect of oak extract application to Verdejo grapevines on grape and wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3253–3263. <https://doi.org/10.1021/jf104178c>
- Nogueira, J. M. F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033>
- Nogueira, J. M. F. (2015). Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 71, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>
- Ochiai, N. (2018). The twister sisters pick up the flavors. *GERSTEL Solutions Worldwide*, 15, 9–12.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., David, F., & Sandra, P. (2018). Recent developments of stir bar sorptive extraction for food applications: Extension to polar solutes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), 7249–7255. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02182>
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Ieda, T., David, F., & Sandra, P. (2013). Multi-stir bar sorptive extraction for analysis of odor compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1315, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.070>
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., & Pfannkoch, E. (2008). Sequential stir bar sorptive extraction for uniform enrichment of trace amounts of organic pollutants in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1200(1), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.069>
- Pardo-García, A. I., De La Hoz, K. S., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines. *Food Chemistry*, 163, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.100>
- Pedroza, M. A., Zalacain, A., Lara, J. F., & Salinas, M. R. (2010). Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE-GC-MS. *Food Research International*, 43 (4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.008>
- Perestrelo, R., Barros, A. S., Rocha, S. M., & Câmara, J. S. (2011). Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L grape varieties. *Talanta*, 85(3), 1483–1493. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.025>
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2014). Origins of grape and wine flavor. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1, 1–24. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>
- Rubio-Bretón, P., Salinas, M. R., Nevares, I., Pérez-Álvarez, E. P., Álamo-Sanza, M. del, Marín-San Román, S., et al. (2019). Recent advances in the study of grape and wine volatile composition: Varietal, fermentative, and aging aroma compounds. In M. Bordiga, & L. M. L. Nollet (Eds.), *Food aroma evolution during food processing, cooking, and aging* (1st ed., pp. 439–463). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429441837-22>
- Salinas, M. R., Zalacain, A., Pardo, F., & Alonso, G. L. (2004). Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during *Vitis vinifera* ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4821–4827. <https://doi.org/10.1021/jf040404c>
- Sampedro, M. C., Goicolea, M. A., Unceta, N., Sánchez-Ortega, A., & Barrio, R. J. (2009). Sequential stir bar extraction, thermal desorption and retention time locked GC-MS for determination of pesticides in water. *Journal of Separation Science*, 32(20), 3449–3456. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900383>
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile, and mineral compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10861–10872. <https://doi.org/10.1021/jf503929v>
- Sánchez-Palomero, E., Alañón, M. E., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., & Pérez-Coello, M. S. (2009). Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. *Talanta*, 79(3), 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.05.019>
- Scherer, N., Marcseková, K., Posset, T., & Winter, G. (2019). New studies on leachables in commercial scale protein drug filling lines using stir bar sorptive extraction coupled with TD-GC-MS and UPLC/QTOF-MS/MS analytics. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 404–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.033>. November 2018.
- Serrano de la Hoz, K. (2014). *Determinación de precursores aromáticos glicosídicos de uvas, mostos y vinos, blancos y tintos. Aplicación en bodega*. Universidad de Castilla La Mancha.
- Serrano de la Hoz, K., Salinas, M. R., & Ferrandino, A. (2016). Different coatings for the HS-SBSE grape volatile analysis in model solution: Preliminary results. *Food Chemistry*, 212, 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.047>
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Tang, K., Hu, J., Fan, W., Xu, Y., & Li, J. M. (2020). Chemometric analysis of Chinese red wines using stir bar sorptive extraction combined with GC-MS analysis. *European Food Research and Technology*, 246(1), 55–67. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03380-3>
- Ubeda, C., Callejón, R. M., Troncoso, A. M., Peña-Neira, Á., & Morales, M. L. (2016). Volatile profile characterisation of Chilean sparkling wines produced by traditional and Charmat methods via sequential stir bar sorptive extraction. *Food Chemistry*, 207, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.117>
- Vasile-Simone, G., Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., Masino, F., Barroso, C. G., & Durán-Guerrero, E. (2017). Application of a stir bar sorptive extraction method for the determination of volatile compounds in different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 939–948. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7818>
- Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71(4), 1610–1615. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.051>
- Zhou, Q., Qian, Y., & Qian, M. C. (2015). Analysis of volatile phenols in alcoholic beverage by ethylene glycol-polydimethylsiloxane based stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1390, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.064>



**4.1.2. Artículo 2: Optimización del método de TF-SPME con las fases absorbentes de PDMS/CAR y PDMS/DVB.**

*Título:* Optimization of thin film-microextraction (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds

*Publicado en:* Analytica Chimica Acta 1226 (2022) 340254

*Autores:* Marín-San Román, S., Carot-Sierra, J. M., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., y Garde-Cerdán, T.

*Resumen*

En este trabajo se optimizó, por primera vez para la extracción de compuestos volátiles en muestras de mosto, el novedoso método de microextracción en fase sólida mediante tira de malla de carbono o película fina (TF-SPME, *Thin Film-Solid Phase Microextraction*), con las fases absorbentes compuestas de polidimetilsiloxano/carboxeno (PDMS/CAR) y PDMS/divinilbenceno (PDMS/DVB).

Para llevar a cabo la optimización se realizó un diseño factorial aleatorio combinando los siguientes factores y niveles: modo de extracción (HS y DI), velocidad de agitación (500 y 1000 rpm), tiempo de extracción (1, 3 y 6 h) y temperatura de extracción (20, 40 y 60 °C).

Se identificaron un total de 26 compuestos volátiles con ambas fases absorbentes clasificados en terpenoides, C<sub>13</sub> norisoprenoides, compuestos bencénicos, ésteres, ácidos grasos, alcoholes superiores, compuestos C<sub>6</sub> y otros compuestos. Con el análisis descriptivo de los datos no se pudo determinar las mejores condiciones para cada fase absorbente que maximizasen la extracción de la mayoría de compuestos volátiles del mosto, por lo que se realizó un análisis estadístico multivariante. Para ambas fases fue necesario el uso de PCA y de



#### 4. RESULTADOS

---

ANOVA multifactorial, puesto que con solo el PCA no era posible determinar las condiciones óptimas.

Según los resultados obtenidos empleando PCA y ANOVA, los mejores resultados con la fase absorbente de PDMS/CAR se produjeron cuando se introdujo la tira de malla de carbono (TF, *Thin Film*) por DI en el mosto, agitando a 500 rpm, durante 6 horas a 20 °C. Para el absorbente de PDMS/DVB, la mejor extracción de compuestos volátiles en mosto se produjo agitando a 500 rpm durante 6 horas a 40 °C, dando igual si la TF se colocaba en el espacio de cabeza o se introducía dentro de la muestra.

Finalmente, se realizó una comparación, mediante ANOVA de un factor, entre las mejores condiciones obtenidas para cada fase absorbente, dando como resultado que la fase compuesta de PDMS/CAR, introducida directamente en el mosto y agitando a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C, proporcionaba mejores resultados que el absorbente de PDMS/DVB.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)

## Optimization of thin film-microextraction (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds

Sandra Marín-San Román<sup>a</sup>, José Miguel Carot<sup>b</sup>, Itziar Sáenz de Urturi<sup>a</sup>, Pilar Rubio-Bretón<sup>a</sup>, Eva P. Pérez-Álvarez<sup>a</sup>, Teresa Garde-Cerdán<sup>a,\*</sup>

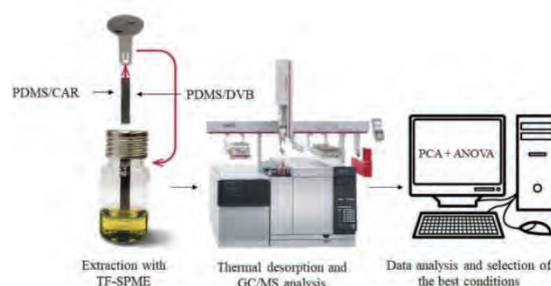
<sup>a</sup> Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Ctra. de Burgos, Km. 6, 26007, Logroño, Spain

<sup>b</sup> Departamento de Estadística e Investigación Operativa Aplicadas y Calidad, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de la Vera s/n, 46022, Valencia, Spain

### HIGHLIGHTS

- TF-SPME was used for the first time to determine volatile compounds in must.
- The novel thin-film microextraction (TF-SPME) technique were optimized.
- PDMS/CAR and PDMS/DVB absorbents were optimized and compared.
- Both absorbents provided a good extraction of volatile compounds in must.
- The absorbent that provided highest extraction of volatile compounds was PDMS/CAR.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

TF-SPME  
Optimization  
Extraction  
Comparison  
Grape aroma  
PDMS/CAR and PDMS/DVB absorbents

### ABSTRACT

It is well known that grape aromatic composition is directly correlated to the final wine quality. To determine this composition, a previous stage of selective extraction is necessary, since the aromatic compounds are found in very low concentrations in the grapes. Therefore, in this work, the thin film microextraction technique (TF-SPME) was optimized, for first time, with the aim to analyze the volatile composition of the grape musts. The results obtained with the two commercially available absorbent materials for TF-SPME, polydimethylsiloxane/carboxene (PDMS/CAR) and PDMS/divinylbenzene (PDMS/DVB), were optimized and compared. To carry out the optimization, a randomized factorial design was performed combining the following factors and levels: extraction mode (headspace (HS), or direct immersion (DI)), stirring speed (500 and 1000 rpm), extraction time (1, 3 and 6 h), and extraction temperature (20, 40 and 60 °C). After performing a principal component analysis (PCA) and an analysis of variance (ANOVA) multifactorial, it was concluded that the best conditions for TF-SPME with PDMS/CAR were: direct immersion (DI), 500 rpm, 6 h, and 20 °C, while for TF-SPME with PDMS/DVB no conditions were found that maximized the extraction of most compounds, therefore compromise conditions were chosen: headspace (HS), 500 rpm, 6 h, and 40 °C. Finally, the comparison between the results obtained with both absorbents indicated that the absorbent that extracted better the volatile compounds from the musts with the TF-SPME technique, was PDMS/CAR, under the conditions: direct immersion (DI), 500 rpm, 6 h, and 20 °C.

\* Corresponding author.

E-mail address: [teresa.garde.cerdan@csic.es](mailto:teresa.garde.cerdan@csic.es) (T. Garde-Cerdán).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340254>

Received 26 March 2022; Received in revised form 27 July 2022; Accepted 9 August 2022

Available online 14 August 2022

0003-2670/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



## 1. Introducción

Grape aroma is one of the most important attributes to determine musts and wines quality [1,2]. Aroma components can be classified according to their origin into: primary aromas, secondary or fermentative aromas, and aging aromas [3]. Primary aromas, also called grape aromas, are composed of varietal and pre-fermentative compounds. Grape aroma depends on several factors, including grape variety, climatic conditions, and viticultural practices [4,5]. Varietal aroma is mainly composed of: monoterpenoids, C<sub>13</sub> norisoprenoids, benzenoids, esters, thiols and methoxypyrazines. Monoterpenoids and C<sub>13</sub> norisoprenoids are the main contributors to wine aroma, and the pre-fermentative aroma are the “green leaf volatiles” or C<sub>6</sub> compounds [2,3,6].

It is necessary to determine and know the aromatic compounds present in the must in order to understand the chemical nature of the wine aroma. These aromatic compounds are found in very low concentrations in the musts, so an effective pre-concentration method is required prior to their analysis in order to carry out their identification and quantification [7–9]. In recent years, different techniques have been used to extract volatile compounds from grapes and wines. From the most classical ones, such as liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE), to more modern ones such as solid-phase microextraction (SPME) and stir bar sorptive extraction (SBSE) [9]. The latter emerged in order to solve some of the drawbacks of LLE and SPE, such as low sensitivity, difficulty of automation, high sample and solvent consumption, etc. [8]. In SPME and SBSE the adsorbents are inserted directly into the thermal desorption system (TD) of the gas chromatograph (GC). SBSE increases the sensitivity by a factor of 50–250 and is much more robust compared to SPME. On the other hand SPME has more absorption materials than SBSE, which improves the polarity range of extractable volatiles and increases the number of applications [8–10]. The fact that there is no technique that greatly increases sensitivity and has multiple adsorbents, prompted the birth of the thin film-SPME (TF-SPME).

TF-SPME was first mentioned by Bruheim et al. [11], to improve the sensitivity of previous methods such as SPME or SBSE [12]. TF-SPME consists of a carbon film (20 mm × 4.8 mm) covered with an adsorbent material. It can be used by headspace (HS) or by direct immersion (DI). In HS mode, the film is placed on a solid or liquid sample in a closed vial. In DI mode, the film is introduced directly into a liquid sample [9, 13]. TF-SPME is more sensitive than SPME because it has a larger phase volume. It also increases the extraction ratio, since it has a larger surface area than SPME [9,12,14,15]. On the other hand, the film is composed of more than one adsorbent material, polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), polydimethylsiloxane/carboxene (PDMS/CAR), and hydrophilic lipophilic balanced/polydimethylsiloxane (HLB/PDMS), thus broadening the range of polarity of the compounds that can be extracted [15,16]. TF-SPME applications are available for the extraction of organic compounds in water [12,17], in cod liver oil [18], and in olive oil [19], of artificial sweeteners in water [20], and the aroma and flavour profile in food samples (dark chocolate, and cheese) and beverages (coffee, wine, lemon, lime soda, and berry sports drink) [13,15,16]. In these works, TF-SPME provided good extractions of volatile compounds, even improving the extraction with SBSE. Therefore, it has been demonstrated that TF-SPME has several advantages over SBSE and SPME in the matrices mentioned above, and then, it is expected to present the same advantages in other matrices, such as grape must. However, this extraction technique has not yet been used for the analysis of volatile compounds in grape musts.

For all these reasons, in this work, the TF-SPME technique has been optimized for the first time for the extraction of volatile compounds in musts. For this purpose, two types of TF currently available on the market have been used: polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) and polydimethylsiloxane/carboxene (PDMS/CAR). The optimization was carried out following a design of experiments (DoE). Once the

compounds have been extracted, they were identified and quantified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and reagents

Chromatographic standards linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, 2-phenylethanol, isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate, 2-phenethyl acetate, hexanoic acid, octanoic acid, isoamyl alcohol (3-methyl-1-butanol), amyl alcohol (2-methyl-1-butanol), isobutanol (2-methyl-1-propanol), 2-octanol (internal standard, I.S.), 1-hexanol, hexanal, the reagent NaCl and ethanol (EtOH), were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified through a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

TF-SPME with PDMS and carboxene (PDMS/CAR), with PDMS and divinylbenzene (PDMS/DVB) (carbon fabric film thickness 450  $\mu$ m), liners packed with Tenax TA™, and borosilicate magnetic stirrers were obtained from GERSTEL GmbH & Co (Mülheim an der Ruhr, Deutschland). BP21 capillary column (50 m length, 0.22 mm i. d., and 0.25  $\mu$ m film thickness) was purchased from SGE (Ringwood, Australia).

Ultra-Turrax was bought from IKA-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Germany). Gas chromatograph was purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The autosampler system consisted of a multi-purpose sampler (MPS), equipped with tube tray, thermal desorption unit (TDU), and cooled injection system (CIS-4) connected to a N<sub>2</sub> ringer. Multi-purpose sampler (MPS) and automated thermal desorption unit (TDU) were provided from GERSTEL.

### 2.2. Grape paste

A total of 50 Tempranillo vines were marked in a vineyard located in Logroño (La Rioja). The bunches belonging to these vines were hand-harvested at their optimal moment of maturation, during the 2019 season, obtaining a total of 44.4 kg of grapes. The bunches were shelled in a box, and subsequently all the berries were mixed. All the berries were crushed in the Ultra-Turrax until a homogeneous paste was obtained. A total of 450 Falcon tubes of 50 mL were filled and frozen (–20 °C) for later use.

### 2.3. Standards solution

In order to perform a better optimization, a standard solution was prepared in which all the standards were added. The concentration of the standards was: 0.001 mg/mL of linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -ionone, isoamyl acetate, hexanoic acid, octanoic acid, isobutanol, hexanal, amyl alcohol, isoamyl alcohol, and 1-hexanol; 0.0002 mg/mL of ethyl octanoate, ethyl hexanoate and ethyl decanoate; and  $9.99 \cdot 10^{-5}$  mg/mL of  $\beta$ -damascenone. This solution was prepared in 12% EtOH.

### 2.4. Design of experiments (DoE)

A randomised factorial design of 4 factors of 2, 3, 3 and 2 levels each was performed. The programme used to perform the DoE was Minitab 18 (Minitab Inc, Pennsylvania, USA). The factors were: stirring speed (500, and 1000 rpm), extraction time (1, 3, and 6 h), extraction temperature (20, 40, and 60 °C), and extraction mode (headspace (HS), and direct immersion (DI)). Samples were run in duplicate, giving a total of 108 assays for each type of adsorbent (PDMS/DVB and PDMS/CAR).

Initially, also the stirring speed of 1500 rpm was tried, but the stirring magnets broke, so we did not continue working at this stirring speed.

### 2.5. Conditioning and cleaning of TF

The TF were conditioned before the first use and after each use. TF



Table 1

Maximum and minimum values of the relative area with respect to 2-octanol (I.S.) of each compound within each absorbent (PDMS/CAR and PDMS/DVB).

	PDMS/CAR		PDMS/DVB	
	Maximum value	Minimum value	Maximum value	Minimum value
<b>Terpenoids</b>				
Linalool	2.21 (HS_1000_6_60)	0.13 (HS_500_3_60)	2.21 (HS_1000_6_60)	0.40 (HS_500_1_20)
$\alpha$ -Terpineol	0.90 (HS_1000_6_60)	0.09 (HS_1000_3_20)	2.22 (HS_1000_6_60)	0.08 (HS_500_1_20)
Geraniol	1.81 (DI_1000_3_40)	0.03 (HS_500_3_60)	1.51 (DI_500_3_40)	0.03 (HS_500_1_20)
<b>C<sub>13</sub> norisoprenoids</b>				
$\beta$ -Damascenone	4.92 (DI_500_6_20)	0.13 (HS_1000_3_20)	1.01 (HS_1000_6_60)	0.04 (HS_500_1_20)
$\beta$ -Ionone	95.16 (DI_500_6_20)	0.18 (HS_1000_3_20)	13.20 (DI_1000_6_60)	0.03 (HS_500_1_20)
<b>Benzenoid compounds</b>				
Benzaldehyde	1.57 (HS_500_1_20)	0.036 (HS_1000_3_20)	0.15 (HS_500_1_20)	0.01 (HS_500_3_40)
2-Phenylethanol	6.80 (DI_500_6_20)	0.15 (HS_1000_3_20)	0.96 (HS_1000_6_60)	0.06 (HS_500_1_20)
<b>Esters</b>				
Isoamyl acetate	2.08 (DI_500_3_20)	0.09 (HS_1000_3_20)	4.84 (HS_1000_1_20)	0.30 (DI_500_3_60)
Ethyl hexanoate	4.25 (DI_500_3_20)	0.21 (HS_1000_3_20)	2.15 (HS_1000_1_20)	0.19 (DI_500_3_20)
Ethyl octanoate	13.43 (DI_500_6_20)	0.13 (DI_1000_1_40)	1.59 (HS_1000_3_20)	0.05 (DI_500_3_20)
Ethyl decanoate	19.54 (DI_500_3_60)	0.007 (DI_1000_1_40)	2.25 (DI_1000_6_60)	0.003 (DI_500_3_20)
<b>Fatty acids</b>				
Hexanoic acid	2.46 (HS_500_1_20)	0.20 (HS_1000_1_40)	1.74 (HS_500_3_20)	0.08 (HS_500_6_20)
Octanoic acid	0.89 (DI_500_3_60)	0.04 (HS_1000_3_20)	0.98 (HS_1000_6_60)	0.02 (HS_500_6_20)
<b>Higher alcohols</b>				
Isoamyl alcohol	0.15 (DI_500_3_60)	0.007 (HS_1000_3_20)	0.32 (HS_500_3_40)	0.007 (HS_1000_1_20)
Amyl alcohol	0.04 (DI_1000_6_40)	0.005 (HS_1000_3_60)	0.12 (HS_500_3_20)	0.002 (DI_500_1_20)
2-Ethyl-1-hexanol	0.20 (HS_500_1_20)	0.009 (HS_500_3_20)	0.55 (HS_500_3_60)	0.002 (DI_1000_6_20)
<b>C6 compounds</b>				
1-Hexanol	1.46 (DI_1000_1_60)	0.44 (HS_1000_3_20)	1.94 (HS_500_1_40)	0.44 (DI_500_1_60)
(Z)-3-Hexen-1-ol	0.26 (DI_1000_1_60)	0.04 (DI_1000_1_40)	0.28 (DI_500_6_20)	0.009 (HS_1000_6_60)
(E)-2-Hexen-1-ol	0.62 (HS_1000_6_40)	0.05 (DI_1000_1_40)	0.28 (DI_500_1_20)	0.001 (DI_500_1_60)
Hexanal	5.39 (HS_500_1_20)	0.12 (HS_1000_3_20)	6.27 (HS_1000_1_20)	0.48 (DI_1000_3_60)
2-Hexenal	4.54 (HS_1000_6_20)	0.23 (HS_1000_3_20)	0.83 (HS_500_3_20)	0.10 (DI_500_3_40)
<b>Other compounds</b>				
Heptanal	3.12 (HS_500_1_20)	0.009 (HS_1000_3_60)	0.06 (HS_1000_6_40)	0.002 (DI_1000_1_40)
Decanal	0.51 (HS_1000_1_60)	0.003 (DI_1000_1_40)	0.09 (HS_1000_6_60)	0.001 (DI_1000_1_40)
Furanmethanol	3.91 (DI_1000_3_40)	0.01 (HS_1000_6_40)	2.18 (DI_1000_6_60)	0.004 (HS_1000_6_40)
Acetol	1.41 (DI_500_3_40)	0.02 (DI_1000_1_40)	0.58 (DI_1000_6_60)	0.002 (DI_500_1_40)
Methyl jasmonate	10.21 (HS_1000_6_20)	0.02 (HS_500_3_40)	4.06 (DI_500_1_60)	0.002 (HS_1000_6_40)

The conditions that gave these values are shown in parentheses. HS: headspace. DI: direct immersion. Stirring speed: 500 or 1000 rpm. Extraction time: 1, 3, or 6 h. Extraction temperature: 20, 40, or 60 °C.

were placed in a desorption tube and thermally desorbed using an autosampler, controlled with GERSTEL MAESTRO software, coupled to the gas chromatography (GC) system. The helium flow was 75 mL/min. Following the manufacturer's recommendations, the TDU temperature programme was set from 40 °C to 250 °C (50 min) at a rate of 100 °C/min. The temperature of the injection system CIS-4 increased from 40 °C to 250 °C (5 min) at a rate of 12 °C/s.

#### 2.6. Optimization of volatile compounds extraction by TF-SPME

An aliquot of 8 mL of centrifuged must sample (15 min, 4500 rpm), 1 mL of the standards solution, and 25  $\mu$ L of the 2-octanol solution (5  $\mu$ L 2-octanol/100 mL EtOH) were added in a 10 mL (DI) or 20 mL (HS) screw capped vial. A TF-SPME (PDMS/CAR, or PDMS/DVB) device was suspended in the screw capped vial. A borosilicate magnetic stirrer was added. All samples were stirred at the working speed (500, or 1000 rpm), at the specified time (1, 3, or 6 h) and at the definite temperature (20, 40, or 60 °C). After extraction, the TF-SPME device was removed, dried with a tissue paper, and was placed in an empty TDU tube with a glass wool plug at the base. The TDU tube was sealed with a transport adapter and placed in a 40 position Twister rack on the MPS robotic for automated analysis.

#### 2.7. TF desorption conditions

The volatile analysis was performed using an automated TDU. The method used for the determination of must volatile composition is based on that described by Sánchez-Gómez et al. [21] with some modifications. TF were thermally desorbed in a stream of helium as carrier gas at

a flow rate of 75 mL/min in the TDU in splitless desorption mode, increasing the temperature from 40 °C to 250 °C at a rate of 60 °C/min and holding at the final temperature for 5 min. The analytes were focused in a programmed temperature vaporising injector (CIS-4), containing a Tenax TA-packed liner with 20 mg of Tenax, held at -40 °C with liquid N<sub>2</sub> cooling prior to injection. After desorption and focusing, the CIS-4 temperature was programmed from -40 °C to 230 °C at 12 °C/s and held at 240 °C for 5 min to transfer volatiles onto the analytical column. The CIS-4 operated in solvent vent mode (purge flow to split vent of 80 mL/min, vent 75 mL/min and pressure 20.85 psi).

#### 2.8. Chromatographic conditions for TF-SPME

The desorbed volatile compounds were separated in an Agilent 7890A gas chromatograph system (GC) coupled to a triple quadrupole (QqQ) Agilent 7000C electron ionization mass spectrometric detector, operating in simple quadrupole (Q).

The oven temperature of GC was programmed at 40 °C (2 min), raised to 80 °C (5 °C/min, held for 2 min) then to 130 °C (10 °C/min, held 5 min) then to 150 °C (5 °C/min, held for 5 min) and finally to 230 °C (10 °C/min, held 5 min). Transfer line temperature was 230 °C. The MS operated in scan mode (35–300 amu) with ionization energy set at 70 eV. In order to carry out the identification of each compound, the mass spectra obtained were compared with those of the NIST library, and chromatographic retention index of each standard. Compounds for which no standard was added were identified by comparing their mass spectra with NIST. To avoid matrix interferences, it was integrated by ion extraction chromatogram (EIC), isolating the target ion of each compound individually. The target ions were *m/z* 41 for 2-hexenal, *m/z*



Table 2

Variables (compounds) of each principal component (PC) for each of the absorbents (PDMS/CAR and PDMS/DVB).

PC	PDMS/CAR	PDMS/DVB
1	$\alpha$ -Terpineol (0.87) $\beta$ -Damascenone (0.85) $\beta$ -Ionone (0.79) Linalool (0.77) Ethyl octanoate (0.75) Ethyl decanoate (0.72) Geraniol (0.64) Decanal (0.60)	Isoamyl acetate (0.91) Hexanal (0.91) Ethyl hexanoate (0.79) Amyl alcohol (0.76) 2-Hexenal (0.73) 1-Hexanol (0.72)
2	Heptanal (0.92) Benzaldehyde (0.90) Hexanoic acid (0.89) 2-Ethyl-1-hexanol (0.77)	Ethyl octanoate (0.91) Ethyl decanoate (0.86) $\beta$ -Ionone (0.79) $\beta$ -Damascenone (0.79)
3	(Z)-3-Hexen-1-ol (0.92) (E)-2-Hexen-1-ol (0.91) 1-Hexanol (0.90) Hexanal (0.67)	2-Phenylethanol (0.94) Octanoic acid (0.91) $\alpha$ -Terpineol (0.74) Geraniol (0.67)
4	Isoamyl acetate (0.92) Ethyl hexanoate (0.87)	(E)-2-Hexen-1-ol (0.86) (Z)-3-Hexen-1-ol (0.78) Hexanoic acid (-0.74)
5	Methyl jasmonate (0.90) 2-Hexenal (0.82)	Acetol (0.94) Furanmethanol (0.89)
6	Furanmethanol (0.71) Octanoic acid (0.65) 2-Phenylethanol (0.64)	Heptanal (0.72) Isoamyl alcohol (0.61)
7	–	2-Ethyl-1-hexanol (0.91)

The percentage weight of each variable within each component is shown in parentheses.

43 for isoamyl acetate, decanal, and acetol,  $m/z$  45 for 2-octanol (I.S.),  $m/z$  55 for isoamyl alcohol,  $m/z$  56 for 1-hexanol, and hexanal,  $m/z$  57 for amyl alcohol, 2-ethyl-1-hexanol, and (E)-2-hexen-1-ol,  $m/z$  59 for  $\alpha$ -terpineol,  $m/z$  60 for hexanoic acid, and octanoic acid,  $m/z$  67 for (Z)-3-hexen-1-ol,  $m/z$  69 for  $\beta$ -damascenone, and geraniol,  $m/z$  70 for heptanal,  $m/z$  71 for linalool,  $m/z$  77 for benzaldehyde,  $m/z$  83 for methyl jasmonate,  $m/z$  88 for ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate,  $m/z$  91 for 2-phenylethanol,  $m/z$  98 for furanmethanol, and  $m/z$  177 for  $\beta$ -ionone. Finally, a semi-quantification was carried out by comparing the area of each compound with that of 2-octanol (I.S.), thus obtaining the relative area.

### 2.9. Method validation

Method validation has been carried out for the optimized conditions, i.e., PDMS/CAR thin film, direct immersion, 20 °C, 6 h, and agitation at 500 rpm.

The selectivity of the method is the ability of an analytical method to accurately and specifically measure the analyte without interference from impurities, degradation products or excipients that may be present in the sample. No interference peaks were observed in any of the samples.

The accuracy and precision of the method was validated by the recovery (%) and the RSD (%), respectively. For this purpose, the same sample was measured 8 times. The recovery (%) values obtained were in the range of 79.19–106.84%. The RSD (%) values were in the range of 4.2–17.76%.

The linearity of the method was studied using 4–7 points of different concentrations ( $\mu\text{g/L}$ ), for each of the standards. Three replicates of each point were performed. A good linearity was observed with determination coefficients ( $R^2$ ) in the range of 0.964–0.996.

### 2.10. Statistical analysis

Statistical analysis was proposed in which the values of relative area of all the volatile compounds obtained in each of the described experimental conditions studied simultaneously in order to find which conditions maximize the overall extraction of volatiles compounds. Prior to the analysis, an exhaustive descriptive analysis was performed to detect and eliminate, when necessary, the outliers. This descriptive analysis verified that there was a significant degree of correlation between the volatile compounds, justifying the need to analyze all the volatile compounds together using a multivariate treatment.

First, a principal component analysis was performed to reduce the dimensionality of the problem by synthesizing the volatile compounds into a reduced number of principal components [22]. In order to facilitate the interpretation of the principal components obtained, a varimax rotation was applied. Secondly, and consistent with the experimental design described above, a multifactorial analysis of variance (ANOVA) was used, taking the scores of each principal component as the response variable.

Finally, an ANOVA was performed to compare the best conditions of the two absorbents (PDMS/CAR, and PDMS/DVB). In this case, the volatile compounds were not treated as a set, but the relative area values of each were compared individually.

## 3. Results and discussion

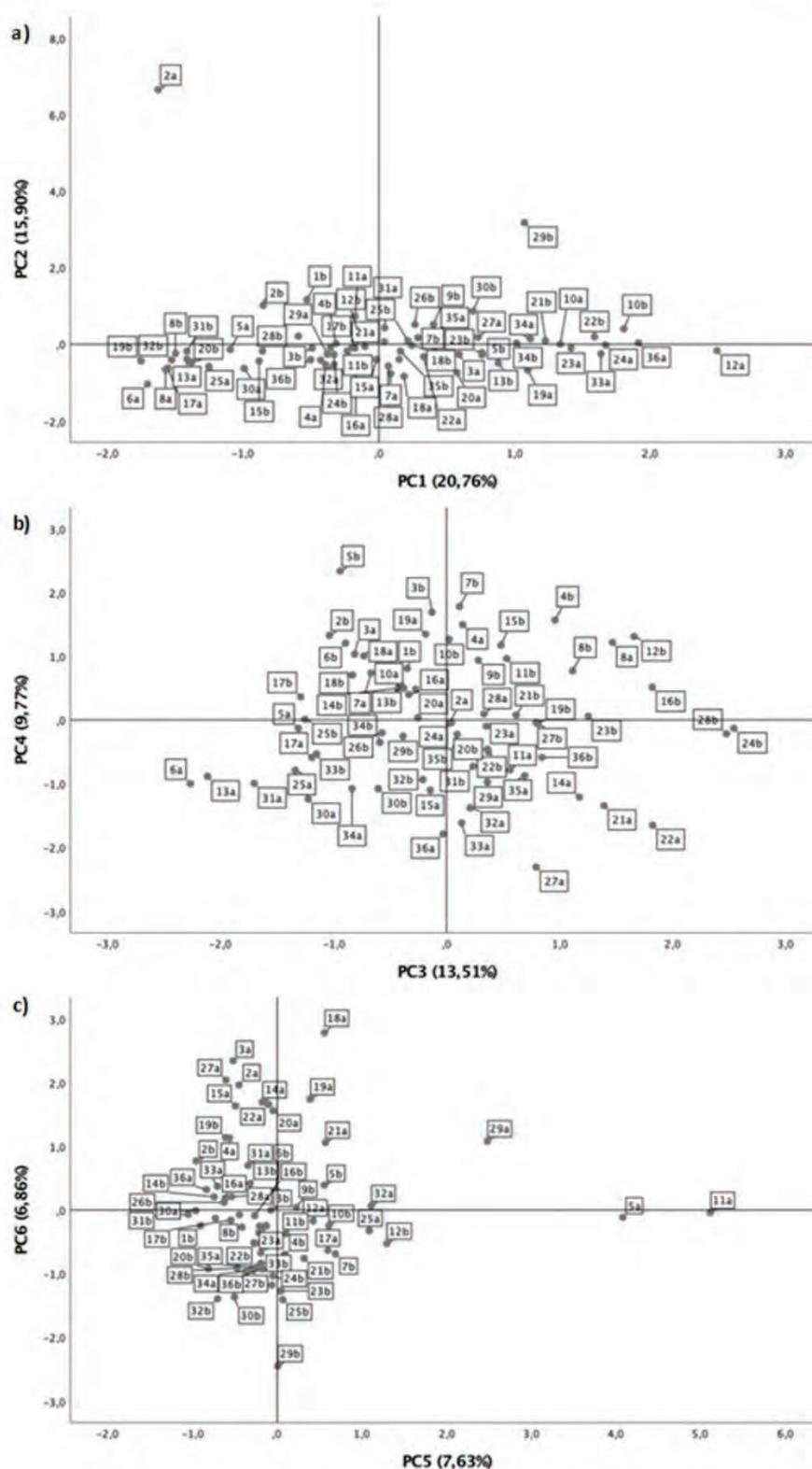
### 3.1. Must volatile composition

The maximum and minimum values of relative area obtained for each volatile compound with each of the absorbents can be seen in Table 1. In order to simplify the results description, only the conditions that gave the maximum and minimum value for each compound are shown. The musts compounds that were identified in the chromatograms are those shown in Table 1.

With both, the PDMS/CAR and the PDMS/DVB absorbents, a total of 26 compounds were identified. These compounds were classified into 8 chemical families: terpenoids (linalool,  $\alpha$ -terpineol, and geraniol),  $C_{13}$  norisoprenoids ( $\beta$ -damascenone, and  $\beta$ -ionone), benzenoid compounds (benzaldehyde, and 2-phenylethanol), esters (isoamyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate), fatty acids (hexanoic acid, and octanoic acid), higher alcohols (isoamyl alcohol, amyl alcohol, and 2-ethyl-1-hexanol),  $C_6$  compounds (1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, (E)-2-hexen-1-ol, hexanal, and 2-hexenal), and other compounds (heptanal, decanal, furanmethanol, acetol, and methyl jasmonate). Within these, terpenoids,  $C_{13}$  norisoprenoids, and some benzenoid compounds are those that have the lowest perception thresholds, so their contribution to the aroma is important [4,23]. In the case of terpenoids,  $\alpha$ -terpineol was best extracted with the PDMS/DVB absorbent, while geraniol was a little better extracted with the PDMS/CAR absorbent. On the other hand, it can be observed that in both absorbents, the best conditions for the extraction of linalool and  $\alpha$ -terpineol compounds were headspace, 1000 rpm, 6 h, and 60 °C (HS\_1000\_6\_60) (Table 1). Geraniol also matched in that with both absorbents it was most effectively extracted by direct immersion, for 3 h and at 40 °C. Terpenoids are formed from the precursor mevalonate, a metabolite derived from acetyl-CoA [2]. Linalool,  $\alpha$ -terpineol, and geraniol are among the most important terpenoids for grape aroma [24]. Linalool is associated with the aromatic descriptors coriander seed, and rose and geraniol with geranium and rose [3,25].

In the case of  $C_{13}$  norisoprenoids, both  $\beta$ -damascenone and  $\beta$ -ionone compounds were most effectively extracted with the PDMS/CAR absorbent. Within this, the best conditions were, for both, direct immersion, 500 rpm, 6 h, and 20 °C (DI\_500\_6\_20) (Table 1).  $C_{13}$  norisoprenoids are compounds derived from the breakdown of carotenoids [26–29].  $\beta$ -Damascenone, and  $\beta$ -ionone are two of the most important  $C_{13}$  norisoprenoids due to their low perception thresholds [24,30]. For





**Fig. 1.** Principal component analysis plots for PDMS/CAR absorbent. a) PC1 vs PC2, b) PC3 vs PC4, and c) PC5 vs PC6. Each number shown in the graphic corresponds to a combination of conditions. The letters a and b after each number correspond to the two replicates of each combination of conditions.

$\beta$ -damascenone descriptors of baked apples, honey, and floral fruity aromas have been reported [26,30,31]. The  $\beta$ -ionone contributes violet aroma to red wine [30].

The benzenoid compounds benzaldehyde and 2-phenylethanol were

also better extracted with PDMS/CAR absorbent than with PDMS/DVB absorbent. Benzaldehyde was better extracted under the following conditions: headspace, 500 rpm, 1 h, and 20 °C (HS\_500\_1\_20), with both absorbents (Table 1). The most important benzenoid compound is



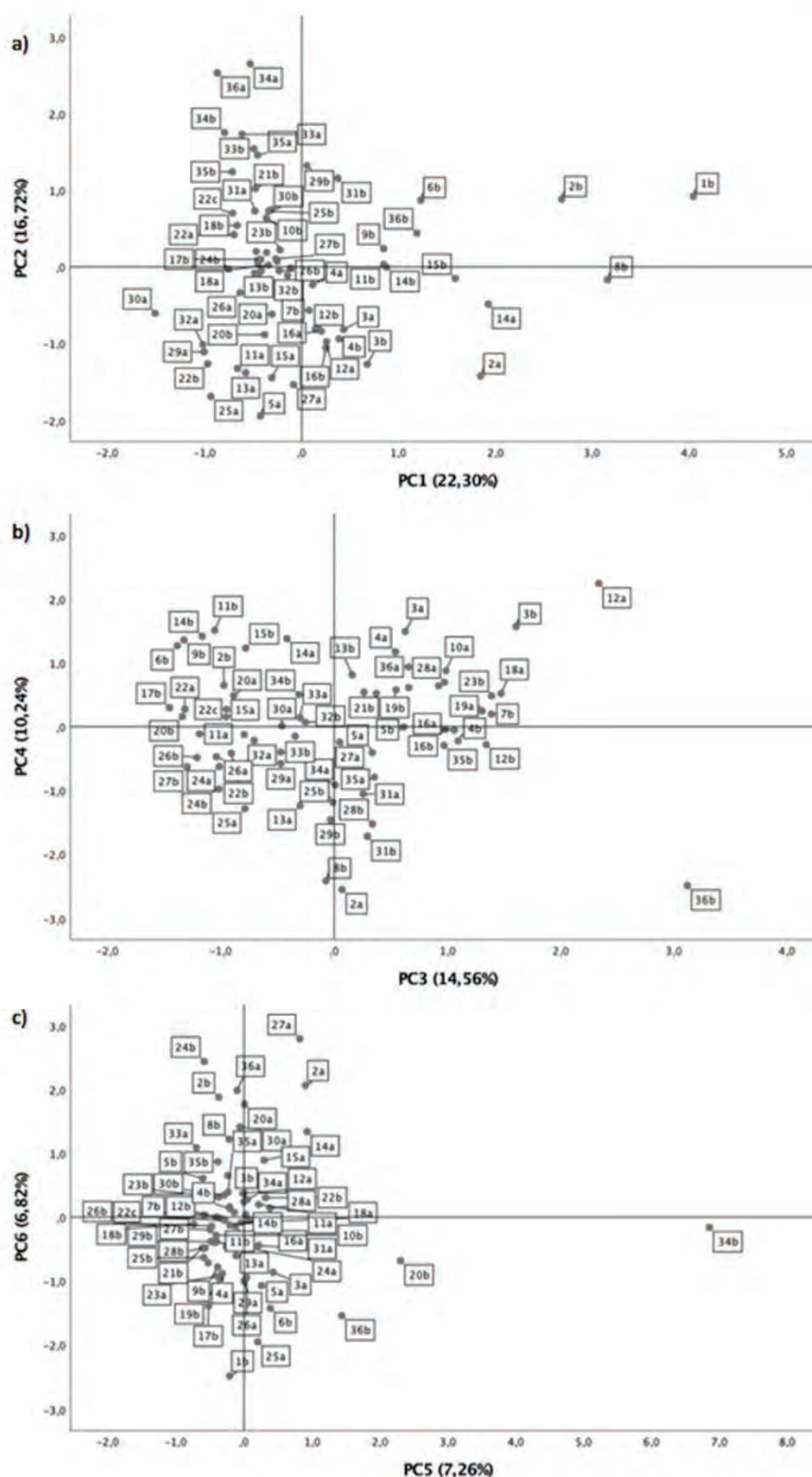


Fig. 2. Principal component analysis plots for PDMS/DVB adsorbent. a) PC1 vs PC2, b) PC3 vs PC4, and c) PC5 vs PC6. Each number shown in the graphic corresponds to a combination of conditions. The letters a and b after each number correspond to the two replicates of each combination of conditions.

2-phenylethanol, which provides floral aromas [3].

The esters ethyl hexanoate, ethyl octanoate, and ethyl decanoate were better extracted with the PDMS/CAR adsorbent, while isoamyl acetate was better extracted with the PDMS/DVB adsorbent (Table 1).

Esters play an important role in wine aroma, but are mainly formed during the alcoholic fermentation [1], and the ethyl esters contribute to the pleasant aroma of wines.

Regarding the fatty acids in musts, hexanoic acid was better



**Table 3**  
Tests of inter-subject effects obtained from multifactorial analysis of variance (ANOVA) for each absorbent (PDMS/CAR and PDMS/DVB).

PC	PDMS/CAR						PDMS/DVB											
	1	2	3	4	5		1	2	3	4								
Individual	Mode	2.465	0.126	0.099	0.755	0.387	0.192	0.664	0.037 <sup>a</sup>	0.092	0.764	0.200	0.658	0.219	0.643	0.261	0.613	
	RPM	0.014	0.907	0.294	0.653	0.102	0.751	0.854	0.006 <sup>a</sup>	6.185	0.006 <sup>a</sup>	0.869	0.430	0.222	0.802	0.260	0.773	
	Time	9.843	0.000 <sup>a</sup>	1.137	0.263	6.353	0.005 <sup>a</sup>	1.539	0.230	2.626	0.087	14.600	0.003 <sup>a</sup>	7.241	0.003 <sup>a</sup>	0.139	0.712	0.770
	T <sup>a</sup>	0.260	0.773	3.135	0.057	1.335	0.277	19.779	0.000 <sup>a</sup>	1.813	0.179	38.234	0.000 <sup>a</sup>	4.653	0.017 <sup>a</sup>	1.567	0.225	0.004 <sup>a</sup>
Second-order interactions	Mode/RPM	0.000	0.990	0.099	0.755	0.387	0.192	0.664	0.037 <sup>a</sup>	0.092	0.764	0.200	0.658	0.219	0.643	0.261	0.613	
	Mode/Time	0.611	0.549	4.756	0.015 <sup>a</sup>	0.06	0.942	0.159	0.854	1.330	0.278	6.185	0.006 <sup>a</sup>	0.869	0.430	0.222	0.802	0.260
	Mode/T <sup>a</sup>	2.039	0.146	2.227	0.124	0.035	0.966	0.017	0.983	0.101	0.904	15.993	0.000 <sup>a</sup>	2.592	0.092	15.225	0.000	1.943
	RPM/Time	0.032	0.968	0.602	0.553	2.831	0.073	0.227	0.798	1.581	0.221	0.469	0.630	0.508	0.607	0.499	0.612	1.356
RPM/T <sup>a</sup>	0.169	0.845	0.363	0.698	1.460	0.247	0.341	0.714	0.846	0.438	1.164	0.326	0.760	0.477	4.510	0.019	0.974	
	0.068	0.991	2.357	0.074	1.476	0.232	0.709	0.592	1.369	0.266	4.132	0.009 <sup>a</sup>	2.872	0.040	2.281	0.084	1.283	

<sup>a</sup> Indicates significant effect of the factor or second-order interaction ( $p \leq 0.05$ ). Mode: Extraction mode. RPM: Stirring speed. Time: Extraction time. T<sup>a</sup>: Extraction temperature.

extracted with PDMS/CAR, while octanoic acid improved its extraction with the PDMS/DVB absorbent (Table 1). Fatty acids are precursors of a large number of alcohols, aldehydes, ketones, acids, esters, and lactones [1].

In the case of higher alcohols, all are better extracted with the PDMS/DVB absorbent (Table 1). On this absorbent, the three compounds were better extracted with the following conditions: headspace, 500 rpm, and 3 h (Table 1).

Respect to the C6 compounds in the musts, 1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, and hexanal, were better extracted with the PDMS/DVB absorbent, while (E)-2-hexen-1-ol, and 2-hexenal, with the PDMS/CAR absorbent. C6 compounds, in high concentrations, can provide negative notes to the wines. C6 compounds mainly consist of alcohols and aldehydes. These compounds are derived from the fatty acids and are responsible for herbaceous and green aromas, therefore they are called "green leaf volatiles" [1,4,32].

Finally, the other compounds that could be identified in the musts samples, were better extracted with PDMS/CAR absorbent. Although there are currently no studies comparing PDMS/CAR TFs versus PDMS/DVB TFs for the extraction of volatile compounds in musts by TF-SPME, there are some studies comparing fibers formed by these same absorbents for the extraction of volatile compounds with SPME. Jelen [33] compared the fiber coatings: polydimethylsiloxane (PDMS), polyacrylate (PA), carboxene/divinylbenzene/polydimethylsiloxane (CAR/DVB/PDMS), polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) and polydimethylsiloxane/carboxene (PDMS/CAR) for the extraction of volatile compounds in white wine by HS-SPME. The author observed that the PDMS/CAR fiber provided the best response in the extraction of carbonyl compounds (furfural and benzaldehyde), while the PDMS/DVB fiber gave better results in the extraction of alcohols, esters and terpenes. Moreover, it can be observed that fibers containing CAR in their structure performed much better than the remaining ones. Sánchez-Palomo et al. [34] reported that HS-SPME using a PDMS/DVB fiber is a rapid and useful method for the quantification of volatile compounds in the grape skins and pulp, allowing rapid screening of aromatic compounds in grapes of different varieties or cultivars. On the other hand, Slaghenaufer et al. [35] suggested that the best compromise to efficiently extract all the different classes of volatile sulfur compounds in wine was obtained using HS-SPME with PDMS/CAR fiber. Petrozziello et al. [36] compared various absorbents for the extraction of norisoprenoids in wine, including both, PDMS/DVB and PDMS/CAR. In this case, they observed that the best extraction of  $\beta$ -damascenone and  $\beta$ -ionone compounds occurred with PDMS/DVB fiber, which is the opposite of what was observed in this study.

In view of the results shown in Table 1, it is not possible to choose either the absorbent material or the conditions that maximize the extraction of most of the compounds, so it is necessary to use a multivariate statistical analysis.

### 3.2. Principal component analysis (PCA)

A PCA was performed to reduce the total number of compounds (variables) to a reduced number of principal components (PCs). The number of variables used for each of the absorbents was 26 (Table 1). In all cases, it was found that the Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) test of sampling adequacy obtained sufficiently large values (between 0 and 1): in all cases, values above 0.8 were obtained [37]. Bartlett's test of sphericity was also significant in all cases. Both tests indicated that the underlying PC extraction method was adequate. The values of the communalities of each of the variables were high in all cases. With this analysis, 6 principal components were retained in TF-SPME-PDMS/CAR, and 7 in TF-SPME-PDMS/DVB. This analysis has simplified the study of the relationship between the values obtained in the aromatic profile with the experimental factors, since it has allowed the identification of groups of volatile compounds with correlative performance. Table 2 shows the compounds that make up each of the PCs.



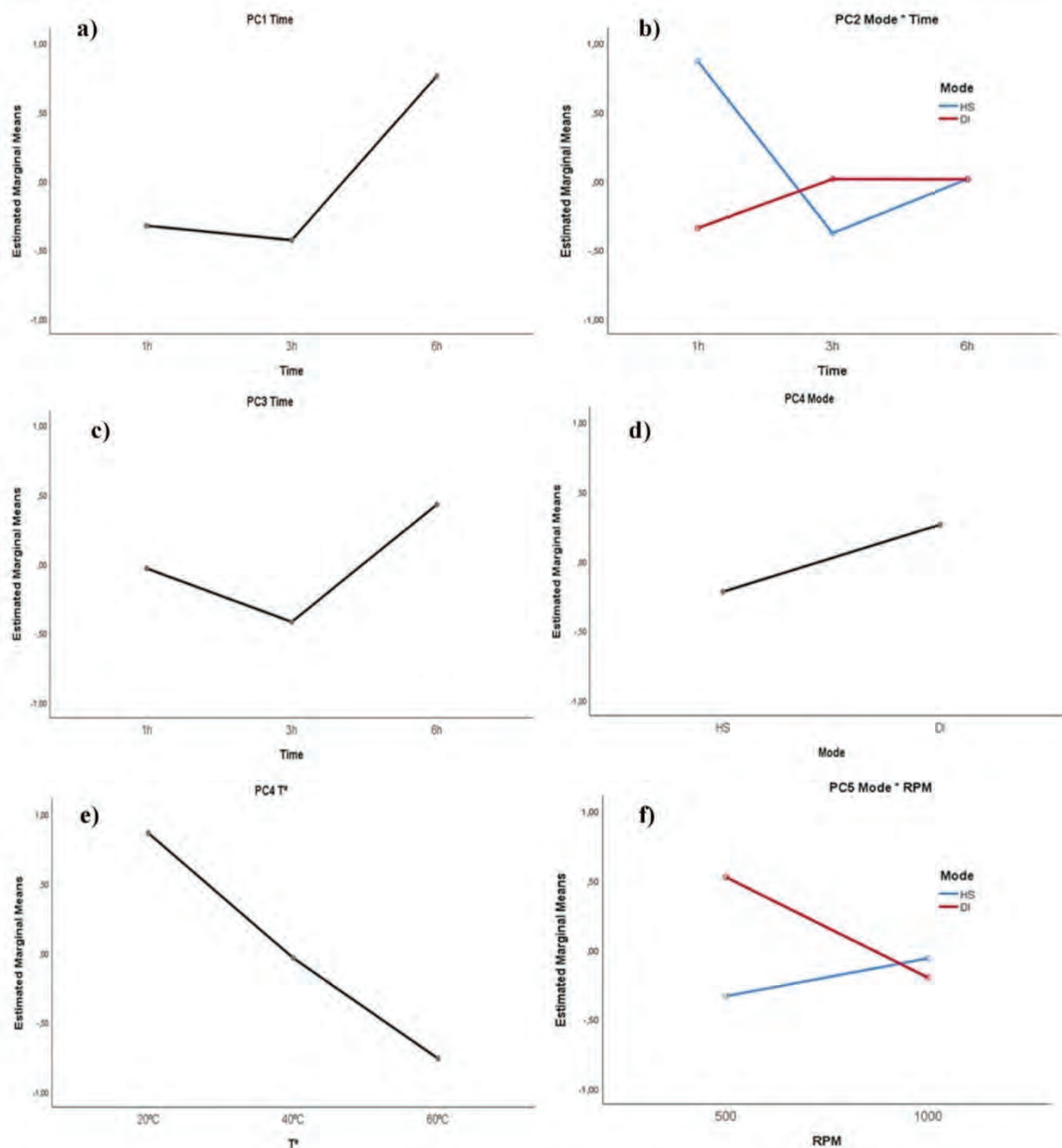


Fig. 3. Plots of estimated marginal means for PDMS/CAR absorbent. a) Time factor for PC1, b) Mode\*Time interaction for PC2, c) Time factor for PC3, d) Mode factor for PC4, e) Temperature factor for PC4, and f) Mode\*RPM interaction for PC5.

### 3.2.1. PDMS/CAR

A total of 6 PCs were obtained, explaining an overall variance of 74.43%. PC1 is formed by the three terpenoids ( $\alpha$ -terpineol, linalool, and geraniol), the two  $C_{13}$  norisoprenoids ( $\beta$ -damascenone, and  $\beta$ -ionone), two esters (ethyl octanoate, and ethyl decanoate), and decanal (Table 2). PC2 is formed by heptanal, the benzenoid compound benzaldehyde, the fatty acid hexanoic acid, and the higher alcohol 2-ethyl-1-hexanol. PC3 is composed of four  $C_6$  compounds ((*Z*)-3-hexen-1-ol, (*E*)-2-hexen-1-ol, 1-hexanol, and hexanal). PC4 consists of the esters isoamyl acetate and ethyl hexanoate. PC5 is formed by methyl jasmonate, and the  $C_6$  compound 2-hexenal. Finally, PC6 is formed by furanmethanol, the fatty acid octanoic acid, and the benzenoid compound 2-phenylethanol (Table 2). For this PDMS/CAR absorbent, the resulting groups were quite ordered according to their chemical family.

Fig. 1 shows the plots of the sample scores on the PCA for the PDMS/CAR absorbent. Fig. 1a shows the PCA for PC1 and PC2. PC1 explains a variance of 20.76%, and PC2 of 15.90%. Fig. 1b shows the PCA for PC3

and PC4. PC3 explains a variance of 13.51%, and PC4 explains a variance of 9.77%. Finally, Fig. 1c shows the PCA of PC5 and PC6. PC5 explains a variance of 7.63%, and PC6 explains a variance of 6.86%. In Fig. 1a and b, there was no sample that deviated excessively from the rest. However, in Fig. 1c, samples 29a, 5a, and 11a, are separated at PC5. Despite this, no conclusion can be made because each sample was run in duplicate, and their pairs are next to the rest of the samples, so it does not indicate that these conditions are the best for the extraction of the compounds from PC5. For the choice of the best conditions, it was necessary to use ANOVA.

### 3.2.2. PDMS/DVB

A total of 7 PCs have been formed, which explain a total variance of 77.90%. The compounds with the highest weight in PC1 was formed by two esters (isoamyl acetate, and ethyl hexanoate), three  $C_6$  compounds (hexanal, 2-hexenal, and 1-hexanol), and one higher alcohol (amyl alcohol) (Table 2). PC2 was formed by two esters (ethyl octanoate, and



**Table 4**

Best conditions within each principal component chosen from inter-subject tests and plots of estimated marginal means, and global conditions for each absorbent (PDMS/CAR and PDMS/DVB).

PDMS/CAR				PDMS/DVB			
PC	Compounds	Best conditions	Opt. conditions	PC	Compounds	Best conditions	Opt. conditions
1	$\alpha$ -Terpineol	6 h	DI_500_6_20	1	Isoamyl acetate	HS 1 h > HS 3 h > HS 6 h HS 20 °C > HS 40 °C > HS 60 °C 20 °C-1 h > 20 °C-3 h > 40 °C-1 h	HS_500_6_40
	$\beta$ -Damascenone				Hexanal		
	$\beta$ -Ionone				Ethyl hexanoate		
	Linalool				Amyl alcohol		
	Ethyl octanoate				2-Hexenal		
	Ethyl decanoate				1-Hexanol		
	Geraniol						
2	Decanal	HS 1 h > > DI 3 h $\approx$ DI 6 h > > HS 6 h	2	Ethyl octanoate	6 h > 3 h > 1 h 60 °C > 40 °C = 20 °C		
	Heptanal			Ethyl decanoate			
	Benzaldehyde			$\beta$ -Ionone			
	Hexanoic acid			$\beta$ -Damascenone			
3	2-Ethyl-1-hexanol	6 h	3	2-Phenylethanol	DI > HS		
	(Z)-3-Hexen-1-ol			Octanoic acid			
	(E)-2-Hexen-1-ol			$\alpha$ -Terpineol			
	1-Hexanol			Geraniol			
4	Hexanal	DI	4	2-Hexen-1-ol (Z)-3-Hexen-1-ol	20 °C $\approx$ 40 °C		
	Isoamyl acetate			Hexanoic acid			
5	Ethyl hexanoate	20 °C	5	Acetol	No significative		
	Methyl jasmonate			Furanmethanol			
6	2-Hexenal	DI-500	6	Heptanal	No significative		
	Furanmethanol			Isoamyl alcohol			
	Octanoic acid						
-	2-Phenylethanol	No significative	-	7	2-Ethyl-1-hexanol	No significative	

HS: headspace. DI: direct immersion. Stirring speed: 500 or 1000 rpm. Extraction time: 1, 3, 6 h. Extraction temperature <sup>a</sup>: 20, 40, 60 °C.

ethyl decanoate), and two C<sub>13</sub> norisoprenoids ( $\beta$ -ionone, and  $\beta$ -damascenone). PC3 was composed of a benzenoid compound (2-phenylethanol), a fatty acid (octanoic acid), and two terpenoids ( $\alpha$ -terpineol, and geraniol). PC4 was formed from two C<sub>6</sub> compounds ((E)-2-hexen-1-ol, and (Z)-3-hexen-1-ol), and a fatty acid (hexanoic acid). PC5 was composed from two compounds from the group defined as "others" (acetol, and furanmethanol). PC6 was formed by another compound of the group "others" (heptanal), and a higher alcohol (isoamyl alcohol). Finally, PC7 was formed by the higher alcohol 2-ethyl-1-hexanol.

In the case of the PDMS/DVB sorbent, each of the PCs consisted of several families of compounds, whereas in the PDMS/CAR sorbent, most of the groups consisted mainly of one or two families (Table 2).

Fig. 2 shows the PCA corresponding to the PDMS/DVB absorbent. Fig. 2a shows the PCA of PC1 and PC2. PC1 explained a variance of 22.30%, and PC2 explained a variance of 16.72%. Fig. 2b shows the PCA of PC3 and PC4. PC3 explained a variance of 14.56%, and PC4 explained a variance of 10.24%. Fig. 2c shows the PCA of PC5 and PC6. PC5 explained a variance of 7.26%, and PC6 explained a variance of 6.82%. Samples 2a and 2b correspond to two replicates of the same conditions, but the separation between samples 2a and 2b from the rest of the samples is not significant enough to conclude that these conditions are the best for the extraction of most volatile compounds (Fig. 2a). In Fig. 2b, the samples that separate to a greater extent from the rest are 12a and 36b, but these conditions cannot be chosen, since they do not correspond to two replicates. Finally, in Fig. 2c, sample 34b is the one that maximises the extraction of compounds belonging to PC5, but its replicate is placed next to all the others. Therefore, in order to choose the pair of conditions that maximises the extraction of most of the volatile compounds, ANOVA has to be used.

### 3.3. Selection of optimal conditions for most volatile compounds extraction

ANOVA was used to choose which conditions optimized the extraction of volatile compounds. To do this, it was checked that all the parametric assumptions necessary for the use of this technique were met. Table 3 shows the results of the test of inter-subject effects, showing the F value as well as the p value for each PC. The factors or interactions

that were significant within each PC and each sorbent were studied.

#### 3.3.1. PDMS/CAR

Table 3 shows that for PC1 and PC3, only the Time factor was significant. In PC2, only the Mode\*Time interaction was significant. In PC4, the Mode and T<sup>a</sup> factors were significant. Finally, in PC5 only the Mode\*RPM interaction was significant. In the case of PC6 neither factor or interaction was significant, so it is not shown in Table 3.

Once the factors and interactions that had a significant effect were known, the plots of marginal means of these factors or interactions were studied (Fig. 3). Fig. 3 shows the plots of marginal means of the individual factors and interactions that had a significant effect, resulting from the ANOVA performed with the results obtained by TF-SPME-PDMS/CAR. Fig. 3a shows the plot for the Time factor in PC1. It can be observed that the best time conditions for the extraction of the compounds belonging to PC1 were 6 h (Table 4). Fig. 3b shows the Mode\*Time interaction for PC2. In this case the best conditions for the extraction of compounds belonging to PC2 were headspace (HS) for 1 h (Table 4). In Fig. 3c it can be observed that the best conditions for the Time factor for compounds belonging to PC3 are 6 h (Table 4). Fig. 3d and e shows the graphs for the Mode and T<sup>a</sup> factors, respectively, in PC4. The mode that obtained the best results for this group of volatile compounds was direct immersion (DI) (Table 4) and the temperature 20 °C (Table 4). Finally, Fig. 3f shows the Mode\*RPM interaction for PC5. It can be seen that the combination of conditions that showed the best extraction of compounds belonging to PC5 was working by direct immersion (DI) at 500 rpm (Table 4).

Table 4 shows the best conditions within each PC, as well as the optimal conditions finally chosen for each group of compounds. The selection of the optimal conditions of each absorbent has been carried out considering the experimental conditions that produce the highest values in each of the principal components, and searching among them for an equilibrium solution in order to find the global maximization. In this case, for PDMS/CAR, the optimum conditions chosen were: direct immersion, 500 rpm, 6 h, 20 °C (DI\_500\_6\_20) (Table 4). These conditions only slightly compromised the extraction of compounds belonging to PC2, as they are not the best conditions for that group. Despite this, these conditions were chosen because DI-6 h was the second best option



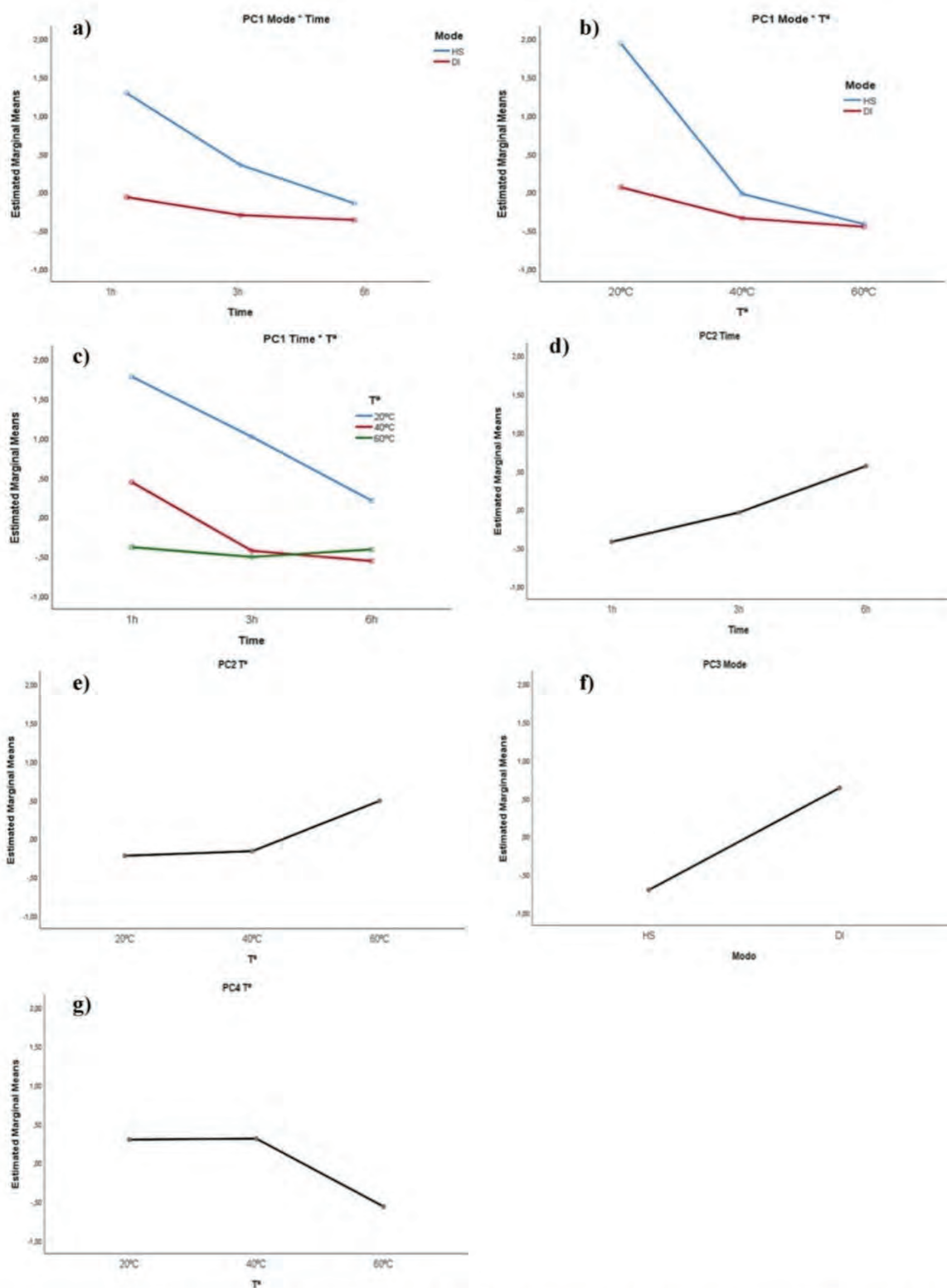


Fig. 4. Plots of estimated marginal means for PDMS/DVB absorbent. a) Mode\* Time interaction for PC1, b) Mode\*Temperature interaction for PC1, c) Time\*Temperature interaction for PC1, d) Time factor for PC2, e) Temperature factor for PC2, f) Mode factor for PC3, and g) Temperature factor for PC4.

for PC2, so the compromise was not going to be very great.

### 3.3.2. PDMS/DVB

Table 3 shows that for PC1 the Mode, Time, and T<sup>a</sup> individual factors and Mode\*Time, Mode\*T<sup>a</sup>, and Time\*T<sup>a</sup> interactions were significant. If

there are significant interactions, the individual factor is not taken into account. For PC2, the factors Time and T<sup>a</sup> were significant. For PC3, only the Mode factor was significant. Finally, for PC4, only the T<sup>a</sup> factor was significant. In the case of PC5, PC6, and PC7 neither factor or interaction was significant, so they are not shown in Table 3.



**Table 5**

Values of relative area with respect 2-octanol (I.S.) obtained with the optimal conditions of the two absorbents (PDMS/CAR and PDMS/DVB) for each of the compounds.

	PDMS/CAR	PDMS/DVB	p
<b>Terpenoids</b>			
Linalool	<b>1.68 ± 0.31</b>	0.92 ± 0.06	<b>0.05*</b>
α-Terpineol	0.54 ± 0.47	0.34 ± 0.06	0.60
Geraniol	0.52 ± 0.25	0.11 ± 0.01	0.11
<b>C<sub>13</sub> norisoprenoids</b>			
β-Damascenone	<b>4.59 ± 1.10</b>	0.18 ± 0.03	<b>0.01*</b>
β-Ionone	<b>69.61 ± 21.16</b>	1.33 ± 0.13	<b>0.02*</b>
<b>Benzenoid compounds</b>			
Benzaldehyde	<b>1.37 ± 0.46</b>	0.04 ± 0.01	<b>0.03*</b>
2-Phenylethanol	<b>0.77 ± 0.03</b>	0.11 ± 0.02	<b>0.00*</b>
<b>Esters</b>			
Isoamyl acetate	0.98 ± 0.16	1.17 ± 0.03	0.21
Ethyl hexanoate	<b>2.72 ± 0.29</b>	0.51 ± 0.06	<b>0.00*</b>
Ethyl octanoate	<b>8.89 ± 3.30</b>	0.43 ± 0.03	<b>0.04*</b>
Ethyl decanoate	4.37 ± 2.97	0.10 ± 0.01	0.15
<b>Fatty acids</b>			
Hexanoic acid	3.06 ± 1.21	0.64 ± 0.52	0.08
Octanoic acid	1.12 ± 0.64	0.18 ± 0.15	0.15
<b>Higher alcohols</b>			
Isoamyl alcohol	0.00 ± 0.00	<b>0.04 ± 0.02</b>	<b>0.01*</b>
Amyl alcohol	0.00 ± 0.00	<b>0.03 ± 0.00</b>	<b>0.00*</b>
2-Ethyl-1-hexanol	<b>0.18 ± 0.02</b>	0.01 ± 0.00	<b>0.00*</b>
<b>C6 compounds</b>			
1-Hexanol	0.87 ± 0.11	0.73 ± 0.06	0.20
(Z)-3-hexen-1-ol	<b>0.09 ± 0.02</b>	0.02 ± 0.02	<b>0.04*</b>
(E)-2-Hexen-1-ol	0.33 ± 0.21	0.01 ± 0.01	0.14
Hexanal	<b>6.25 ± 1.08</b>	0.92 ± 0.08	<b>0.01*</b>
2-Hexenal	<b>1.01 ± 0.07</b>	0.13 ± 0.01	<b>0.00*</b>
<b>Other compounds</b>			
Heptanal	3.32 ± 1.57	0.01 ± 0.00	0.07
Decanal	<b>0.60 ± 0.16</b>	0.02 ± 0.01	<b>0.02*</b>
Furanmethanol	0.96 ± 0.45	0.06 ± 0.08	0.08
Acetol	1.67 ± 0.96	0.02 ± 0.02	0.10
Methyl jasmonate	0.18 ± 0.18	0.01 ± 0.01	0.29

Data are shown as mean ± standard deviation (n = 3 and n = 2). \*indicate significant differences between absorbents (p ≤ 0.05). Bold indicates the highest value of the compound showing significant differences.

As in the previous case, once the significant factors and interactions in each PC are known, the marginal mean plots are used to select the best conditions for these factors or interactions (Fig. 4). Fig. 4 shows the plots of marginal means of the factors and interactions that have a significant effect, resulting from the ANOVA performed with the results obtained by TF-SPME-PDMS/DVB. Fig. 4a, b, and c show the plots of the significant interactions for PC1. The best conditions for the extraction of these compounds were headspace (HS) for 1 h, headspace (HS) at 20 °C, and 1 h at 20 °C (Table 4). In Fig. 4d and e, it can be seen that the best conditions for PC2 were 6 h for the Time factor and 60 °C for the T<sup>th</sup> factor (Table 4). Fig. 4f shows that the best extraction mode for PC3 compounds is by direct immersion (DI) (Table 4). Finally, Fig. 4g shows the best conditions for the T<sup>th</sup> factor for PC4, in this case 20 °C and 40 °C (Table 4).

Table 4 shows the best conditions within each PC, as well as the optimal conditions finally chosen. In the case of PDMS/DVB, it was very difficult to choose optimal conditions, as they were different for each PC. Nevertheless, the conditions 500 rpm, 6 h, and 40 °C were chosen, as it was an intermediate for all PCs, which did not compromise too much the extraction of any group of compounds. Thus, they were tested by headspace and direct immersion (HS/DI\_500\_6\_40). 500 rpm was chosen because it was not a significant factor and it is less aggressive for the magnets.

In order to choose between HS and DI, 2 replicates of HS\_500\_6\_40 conditions and 2 replicates of DI\_500\_6\_40 conditions were made. It was finally obtained that HS\_500\_6\_40 conditions provided a better extraction than DI\_500\_6\_40, providing a higher amount of extraction in most of the compounds.

### 3.4. Comparison of PDMS/CAR and PDMS/DVB optimal conditions

Finally, the optimum conditions for each sorbent were compared. To carry out the comparison, 3 replicates were prepared with PDMS/CAR, by DI, at 500 rpm, for 6 h, at 20 °C, and 2 replicates with PDMS/DVB, by HS, at 500 rpm, for 6 h, at 40 °C (those selected in the previous section).

The results of this comparison are shown in Table 5, which lists the means of the relative area results obtained for each much volatile compound, as well as their standard deviation (n = 3 and n = 2). In the work of Kfoury et al. [16], they compare the three types of absorbents available for TF-SPME, including PDMS/CAR and PDMS/DVB, in beverage extractions. In this work, the results obtained show that the PDMS/CAR sorbent provides better results for low polarity compounds and very volatile compounds (VVOCs). However, the PDMS/DVB sorbent shows better results with volatile compounds (VOCs) and semi-volatile compounds (SVOCs). However, in our work, it can be seen that, in most cases where there were significant differences, the value was higher for the PDMS/CAR absorbent. Linalool, β-damascenone, β-ionone, benzaldehyde, 2-phenylethanol, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, 2-ethyl-1-hexanol, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanal, 2-hexenal, and decanal, were better extracted with the PDMS/CAR sorbent. Nevertheless, isoamyl alcohol, and amyl alcohol were better extracted with the PDMS/CAR sorbent. Therefore, it can be concluded that the sorbent that provides a higher extraction of volatile compounds for the TF-SPME technique is PDMS/CAR, under the conditions: direct immersion (DI), agitation at 500 rpm for 6 h at 20 °C (DI\_500\_6\_20).

## 4. Conclusions

This is the first time that this extraction technique, thin film-microextraction (TF-SPME), has been used to determine the must grape volatile composition. Firstly, it can be concluded that the both sorbents compared, PDMS/CAR and PDMS/DVB are a good choice for the extraction of volatile compounds in must. After studying the principal component analysis (PCA) and the multifactorial analysis of variance (ANOVA), it was concluded that the optimum conditions for the PDMS/CAR sorbent were: direct immersion (DI), agitation at 500 rpm for 6 h at 20 °C (DI\_500\_6\_20). In the case of the PDMS/DVB sorbent, the results were not so conclusive, so two intermediate conditions were tested, finally choosing the conditions: headspace (HS), agitation at 500 rpm for 6 h at 40 °C (HS\_500\_6\_40). Finally, the comparison between the conditions chosen for each sorbent confirmed that the best sorbent for the TF-SPME method in order to extract volatile compounds in must was PDMS/CAR. Therefore, the best absorbent in order to analyze the grape volatile compounds was PDMS/CAR and the optimal conditions were carried out the extraction at 20 °C, during 6 h, by direct immersion (DI), with agitation at 500 rpm.

### CRedit authorship contribution statement

**Sandra Marín-San Román:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft. **José Miguel Carot:** Formal analysis, Writing – review & editing. **Itziar Sáenz de Urturi:** Investigation, Writing – review & editing. **Pilar Rubio-Bretón:** Investigation, Writing – review & editing. **Eva P. Pérez-Álvarez:** Investigation, Writing – review & editing. **Teresa Garde-Cerdán:** Supervision, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Writing – review & editing.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

Financial support was given by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades under the project RTI2018-096549-B-I00. S. M.-S.-R. thanks Gobierno de La Rioja for her predoctoral contract. E.P. P.-Á. thanks the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades for her postdoctoral contract.

## References

- [1] A.L. Robinson, P.K. Boss, P.S. Solomon, R.D. Trengove, H. Heymann, S.E. Ebeler, Origins of grape and wine flavor. Part 1. Chemical components and viticultural impacts, *Am. J. Enol. Vitic.* 1 (2014) 1–24, <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>.
- [2] G. Styger, B. Prior, F.F. Bauer, Wine flavor and aroma, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2011) 1145–1159, <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>.
- [3] P. Rubio-Bretón, M.R. Salinas, I. Nevares, E.P. Pérez-Álvarez, M. del Álamo-Sanza, S. Marín-San Román, G.L. Alonso, T. Garde-Cerdán, Recent advances in the study of grape and wine volatile composition: varietal, fermentative, and aging aroma compounds, in: *Food Aroma Evol.*, 2019, pp. 439–463, <https://doi.org/10.1201/9780429441837-22>.
- [4] S. Marín-San Román, T. Garde-Cerdán, E. Baroja, P. Rubio-Bretón, E.P. Pérez-Álvarez, Foliar application of phenylalanine plus methyl jasmonate as a tool to improve Grenache grape aromatic composition, *Sci. Hort.* (Amst.) 272 (2020) 109515, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109515>.
- [5] T. Garde-Cerdán, L. González-Arenzana, N. López, R. López, P. Santamaría, I. López-Alfaro, Effect of different pulsed electric field treatments on the volatile composition of Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties, *Innovat. Food Sci. Emerg. Technol.* 20 (2013) 91–99, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.08.008>.
- [6] C.A. Black, M. Parker, T.E. Siebert, D.L. Capone, L.L. Francis, Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances, *Aust. J. Grape Wine Res.* 21 (2015) 582–600, <https://doi.org/10.1111/ajgw.12186>.
- [7] R. Perestrelo, A.S. Barros, S.M. Rocha, J.S. Câmara, Optimisation of solid phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties, *Talanta* 85 (2011) 1483–1493, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.025>.
- [8] E. Sánchez-Palomo, M.E. Alañón, M.C. Díaz-Maroto, M.A. González-Viñas, M. S. Pérez-Coello, Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice, *Talanta* 79 (2009) 871–876, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.05.019>.
- [9] S. Marín-San Román, P. Rubio-Bretón, E.P. Pérez-Álvarez, T. Garde-Cerdán, Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds, *Food Res. Int.* 137 (2020) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>.
- [10] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: a review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta* 757 (2012) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033>.
- [11] I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1002–1010.
- [12] Y. Huang, C.S.M. Liew, S.X.L. Goh, R.M.V. Goh, K.H. Ee, A. Pua, S.Q. Liu, B. Lassabliere, B. Yu, Enhanced extraction using a combination of stir bar sorptive extraction and thin film-solid phase microextraction, *J. Chromatogr. A* 1633 (2020), 461617, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461617>.
- [13] J.R. Stuff, J.A. Whitecavage, J.J. Grandy, J. Pawliszyn, Analysis of beverage samples using thin film solid phase microextraction (TF-SPME) and thermal desorption GC/MS, *GERSTEL Appl. Note.* (2018) 1–10.
- [14] Y.A. Olcer, M. Tascon, A.E. Eroglu, E. Boyaci, Thin film microextraction: towards faster and more sensitive microextraction, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 93–101, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.022>.
- [15] L. Vemarelli, J.A. Whitecavage, J.R. Stuff, Analysis of food samples using thin film solid phase microextraction (TF-SPME) and thermal desorption GC/MS, *GERSTEL Appl. Note.* (2019) 1–8.
- [16] N.C. Kfoury, J.A. Whitecavage, J.R. Stuff, Comparison of three types of thin film-solid phase microextraction phases for beverage extractions, *GERSTEL Appl. Note.* 219 (2021).
- [17] R.V. Emmons, T. Liden, K.A. Schug, E. Gionfriddo, Optimization of thin film solid phase microextraction and data deconvolution methods for accurate characterization of organic compounds in produced water, *J. Separ. Sci.* 43 (2020) 1915–1924, <https://doi.org/10.1002/jssc.201901330>.
- [18] D. Gruszecka, J.J. Grandy, E. Gionfriddo, V. Singh, J. Pawliszyn, Direct immersion thin film solid phase microextraction of polychlorinated n-alkanes in cod liver oil, *Food Chem.* 353 (2021), 129244, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129244>.
- [19] M.P. Segura-Borrego, R. Ríos-Reina, C. Ubeda, R.M. Callejón, M. Lourdes Morales, Comparison of the novel thin film-solid phase microextraction and sorptive extraction methods for Picual and Hojiblanca olive oil volatile fraction analysis in headspace, *Foods* 9 (2020) 1–17, <https://doi.org/10.3390/foods9060748>.
- [20] D.M. Cárdenas-Soracá, V. Singh, E. Nazdrajić, T. Vasiljević, J.J. Grandy, J. Pawliszyn, Development of thin-film solid-phase microextraction coating and method for determination of artificial sweeteners in surface waters, *Talanta* 211 (2020), 120714, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120714>.
- [21] R. Sánchez-Gómez, A. Zalacain, G.L. Alonso, M.R. Salinas, Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 10861–10872, <https://doi.org/10.1021/jf503929v>.
- [22] G. James, D. Witten, T. Hastie, R. Tibshirani, An Introduction to Statistical Learning [electronic Resource] : with Applications in R, first ed., vol. 20, Springer New York, New York, 2013 <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7138-7>.
- [23] R. Flamini, P. Traldi, Grape aroma compounds: terpenes, C13-norisoprenoids, benzene compounds, and 3-alkyl-2-methoxyxypazines, in: *Mass Spectrom. Grape Wine Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 97–116.
- [24] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, *Handbook of Enology: Volume 2, the Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Wiley, 2006.
- [25] T. Garde-Cerdán, G. Gutiérrez-Gamboa, E. Baroja, P. Rubio-Bretón, E.P. Pérez-Álvarez, Influence of methyl jasmonate foliar application to vineyard on grape volatile composition over three consecutive vintages, *Food Res. Int.* 112 (2018) 274–283, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.048>.
- [26] M.M. Mendes-Pinto, Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma, *Arch. Biochem. Biophys.* 483 (2009) 236–245, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>.
- [27] P. Darriet, C. Thibon, D. Dubourdieu, Aroma and aroma precursors in grape berry, in: *Biochem. Grape Berry*, 2012, pp. 111–136, <https://doi.org/10.2174/978160805360511201010111>.
- [28] A. Asproudi, A. Ferrandino, F. Bonello, E. Vaudano, M. Pollon, M. Petrozziello, Key norisoprenoid compounds in wines from early-harvested grapes in view of climate change, *Food Chem.* 268 (2018) 143–152, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.069>.
- [29] G. Gutiérrez-Gamboa, S. Marín-San Román, V. Jofré, P. Rubio-Bretón, E.P.E. P. Pérez-Álvarez, T. Garde-Cerdán, Effects on chlorophyll and carotenoid contents in different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) after nitrogen and elicitor foliar applications to the vineyard, *Food Chem.* 269 (2018) 380–386, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.019>.
- [30] E. Tomasino, The potential effect of  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -damascenone on sensory perception of pinot noir wine aroma, *Molecules* 26 (2021) 1–9, <https://doi.org/10.3390/molecules26051288>.
- [31] B. Pineau, J.C. Barbe, C. Van Leeuwen, D. Dubourdieu, Which impact for  $\beta$ -damascenone on red wines aroma? *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 4103–4108, <https://doi.org/10.1021/jf070120r>.
- [32] H. Alem, P. Rigou, R. Schneider, H. Ojeda, L. Torregrosa, Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review, *J. Sci. Food Agric.* 99 (2018) 975–985, <https://doi.org/10.1002/jsfa.9327>.
- [33] H.H. Jelen, A. Szczurek, Solid phase microextraction for profiling volatile compounds in liquored white wines, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 9 (2010) 23–32.
- [34] E. Sánchez-Palomo, M.C. Díaz-Maroto, M.S. Pérez-Coello, Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS, *Talanta* 66 (2005) 1152–1157, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.01.015>.
- [35] D. Slaghenauf, L. Tonidandel, S. Moser, T. Román Villegas, R. Larcher, Rapid analysis of 27 volatile sulfur compounds in wine by headspace solid-phase microextraction gas chromatography tandem mass spectrometry, *Food Anal. Methods* 10 (2017) 3706–3715, <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0930-2>.
- [36] M. Petrozziello, D. Borsa, M. Guaita, V. Gerbi, A. Bosso, Quantification by solid phase micro extraction and stable isotope dilution assay of norisoprenoid compounds in red wines obtained from Piedmont rare varieties, *Food Chem.* 135 (2012) 2483–2489, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.082>.
- [37] J.F. Hair, R.E. Anderson, W.C. Black, B.J. Babin, *Multivariate Data Analysis*, seventh ed., John Wiley & Sons, 2010. Upper Saddle River.

## 4.2. COMPARACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES OBTENIDAS CON LOS MÉTODOS DE SBSE y TF-SPME.

Como se puede ver en el *Apartado 4.1.1*, para la SBSE-GC-MS las mejores condiciones fueron añadiendo el *Twister* en el HS y agitando la muestra a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C y añadiendo NaCl a la mitad del tiempo de extracción. Para la <sup>m</sup>SBSE-GC-MS las mejores condiciones fueron agitación de la muestra a 500 rpm durante 6 horas a 60 °C, sin adición de NaCl. Tras realizar una comparación entre ambas técnicas de extracción, se concluyó que la técnica de SBSE proporcionó mejores resultados que la <sup>m</sup>SBSE. Para el método de TF-SPME-GC-MS (*Apartado 4.1.2*), las mejores condiciones fueron añadiendo la TF de PDMS/CAR por DI y agitando la muestra a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C.

Finalmente, se realizó una comparación entre la mejor combinación de condiciones proporcionada por SBSE y las mejores condiciones para la TF-SPME, con el objetivo de elegir la técnica que maximizase la extracción de compuestos volátiles del mosto, y, de este modo, poder utilizarla como método de referencia para la construcción de los modelos de calibración multivariante a partir de los datos espectrales. Para ello, se analizaron tres muestras de mosto mediante SBSE-GC-MS, y otras tres muestras mediante TF-SPME-GC-MS, se integraron los cromatogramas y, con los valores de área relativa obtenidos, se realizó un ANOVA de un factor. En la *Tabla 4.1* se pueden observar los resultados de la comparación, donde se muestran las medias de los resultados de área relativa obtenidos para cada compuesto, así como su desviación estándar (n = 3).



#### 4. RESULTADOS

**Tabla 4.1.** Valores del área relativa con respecto al 2-octanol (P.I.) obtenidos con la mejor combinación de condiciones de los métodos de SBSE y TF-SPME para cada uno de los compuestos volátiles identificados en los mostos.

	SBSE	TF-SPME	p
Terpenoides			
Linalool	0,69 ± 0,01	<b>1,68 ± 0,31</b>	<b>0,005*</b>
α-Terpineol	0,15 ± 0,01	0,54 ± 0,47	0,219
Geraniol	0,17 ± 0,02	0,52 ± 0,25	0,068
C <sub>13</sub> norisoprenoides			
β-Damascenona	0,06 ± 0,00	<b>4,59 ± 1,10</b>	<b>0,002*</b>
β-Ionona	0,22 ± 0,00	<b>69,61 ± 21,16</b>	<b>0,005*</b>
Bencenoides			
Benzaldehído	0,04 ± 0,01	<b>1,37 ± 0,46</b>	<b>0,007*</b>
2-Feniletanol	0,05 ± 0,01	<b>0,77 ± 0,03</b>	<b>0,000*</b>
Ésteres			
Acetato de isoamilo	<b>2,32 ± 0,24</b>	0,98 ± 0,16	<b>0,001*</b>
Hexanoato de etilo	0,72 ± 0,05	<b>2,72 ± 0,29</b>	<b>0,000*</b>
Octanoato de etilo	0,32 ± 0,01	<b>8,89 ± 3,30</b>	<b>0,011*</b>
Decanoato de etilo	0,07 ± 0,01	4,37 ± 2,97	0,066
Ácidos grasos			
Ácido octanoico	0,15 ± 0,04	1,12 ± 0,64	0,057
Ácido hexanoico	0,23 ± 0,03	<b>3,06 ± 1,21</b>	<b>0,015*</b>
Alcoholes superiores			
Alcohol isoamílico	<b>0,10 ± 0,01</b>	0,00 ± 0,00	<b>0,000*</b>
Alcohol amílico	<b>0,07 ± 0,01</b>	0,00 ± 0,00	<b>0,000*</b>
Compuestos C <sub>6</sub>			
(Z)-3-Hexen-1-ol	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,595
Hexanal	1,79 ± 0,16	<b>6,25 ± 1,08</b>	<b>0,002*</b>
1-Hexanol	1,71 ± 0,56	0,87 ± 0,11	0,062
(E)-2-hexenal	0,10 ± 0,04	<b>1,01 ± 0,07</b>	<b>0,000*</b>
(E)-2-Hexen-1-ol	0,28 ± 0,05	0,33 ± 0,21	0,723
2-Etil-1-hexanol	0,04 ± 0,01	<b>0,11 ± 0,07</b>	<b>0,001*</b>
Otros compuestos			
Decanal	0,04 ± 0,02	<b>0,60 ± 0,16</b>	<b>0,004*</b>
Furanmetanol	0,05 ± 0,03	<b>0,96 ± 0,45</b>	<b>0,026*</b>
Acetol	0,27 ± 0,14	1,67 ± 0,96	0,066
Jasmonato de metilo	0,00 ± 0,00	0,18 ± 0,18	0,160
Heptanal	0,03 ± 0,00	<b>3,32 ± 1,57</b>	<b>0,022*</b>

Los datos se muestran como media ± desviación estándar (n = 3). \*Indican diferencias significativas entre métodos (p ≤ 0,05). Los valores en negrita corresponden al valor más alto del compuesto que muestra diferencias significativas.

#### 4.2. Comparación de las mejores condiciones obtenidas con SBSE y TF-SPME

---

Se pudo comprobar cómo, para la mayoría de compuestos en los que hubo diferencias significativas entre ambos métodos, el método de TF-SPME-GC-MS fue el que proporcionó una mayor extracción, excepto en el caso del acetato de isoamilo, el alcohol isoamílico y el alcohol amílico, que se extrajeron mejor con el método de SBSE-GC-MS.

Puesto que fue el que mejores resultados proporcionó, y con el incentivo de ser una técnica novedosa para este tipo de análisis, el método elegido para la obtención de los valores de referencia de compuestos volátiles en las muestras de uva fue la TF-SPME-GC-MS. Los valores de referencia obtenidos con este método se utilizaron para la construcción de los modelos de calibración y de predicción.





### 4.3. USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO

#### 4.3.1. Artículo 3: Uso de la imagen hiperespectral (HSI) para la predicción de la composición aromática y los TSS en bayas de Tempranillo Blanco

*Título:* Monitorization of varietal aroma composition dynamics during ripening in intact *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries by hyperspectral imaging

*Publicado en:* Journal of Agricultural and Food Chemistry. J. Agric. Food Chem. 2023, 71, 2616–2627

*Autores:* Marín-San Román, S., Fernández-Navales, J., Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Diago, M. P., y Garde-Cerdán, T.

#### *Resumen*

En este trabajo se evaluó el uso de la imagen hiperespectral (HSI) en el rango VIS+SW-NIR (400-1.000 nm) para la monitorización de la composición volátil y de los sólidos solubles totales (TSS), de bayas de uva intactas de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco, a lo largo de su maduración. El objetivo principal fue diseñar, por primera vez, una herramienta basada en HSI, que permitiera estimar, de forma rápida y no invasiva, la composición aromática de las bayas de Tempranillo Blanco en cualquier momento de la maduración.

Se adquirieron un total de 236 espectros de bayas intactas en el laboratorio mediante HSI, donde se pudieron identificar tres picos principales de absorción en el rango visible (VIS), a 450, 500, y 680 nm, y uno en el rango del infrarrojo cercano (NIR), a 976 nm, el cual está asociado al segundo sobretono del enlace O-H. Como valores de referencia, se identificaron y cuantificaron un total de 20

#### 4. RESULTADOS

---

compuestos volátiles, mediante el método de TF-SPME-GC-MS optimizado anteriormente y se midió la concentración de TSS mediante refractometría. El contenido de compuestos volátiles se situó en el rango de 0,0006  $\mu\text{g/L}$  para la  $\beta$ -damascenona, a 7.964,66  $\mu\text{g/L}$  para el (E)-2-hexen-1-ol. Por otro lado, el contenido de los sólidos solubles totales fue desde 11,30 °Brix a 24,90 °Brix.

Tras la construcción de los modelos de calibración mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS, *Modified Partial Least Squares*), se pudo observar que: para los TSS, para los compuestos volátiles  $\alpha$ -terpineol,  $p$ -cimeno,  $\beta$ -damascenona,  $\beta$ -ionona, benzaldehído, alcohol bencílico y hexanal, y para los  $\text{C}_{13}$  norisoprenoides totales, compuestos  $\text{C}_6$  totales y compuestos positivos totales (la suma de todos los compuestos menos los  $\text{C}_6$ ), se obtuvieron valores de coeficiente de determinación de la validación cruzada ( $R^2_{cv} \geq 0,90$ ). Para los compuestos citral, linalool, 2-feniletanol, ácido octanoico, ácido nonanoico, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol y (Z)-3-hexen-1-ol, así como para la familia de los bencenoides totales, se obtuvieron valores de  $R^2_{cv}$  entre 0,70 y 0,89. Para todas las familias y compuestos para los que se obtuvo un valor de  $R^2_{cv} \geq 0,70$  se pudo realizar una predicción cuantitativa con los modelos construidos, lo que permitió una estimación precisa del contenido de estos compuestos en las bayas. Para el resto de familias y compuestos, excepto para los ácidos grasos, cuyo  $R^2_{cv}$  fue de 0,30, se obtuvieron valores de  $R^2_{cv}$  entre 0,50 y 0,69, por lo que el modelo construido permitió discriminar entre concentraciones altas, medias, y bajas de esos compuestos.

Por otro lado, los valores de desviación predictiva residual de validación cruzada ( $\text{RPD}_{cv}$ , *Residual Predictive Deviation*) obtenidos se encontraban entre 1,10 y 8,19, siendo la mayoría de ellos próximos o mayores a 3, lo que significó que los modelos de calibración mostraron un rendimiento predictivo excelente.

### 4.3. Uso de la HSI y la NIRS para la predicción de la composición aromática

---

Los resultados obtenidos mostraron claramente que esta novedosa técnica basada en HSI, sin disolventes, no invasiva y realizada en bayas intactas, es muy efectiva para la estimación de compuestos aromáticos y TSS. Este hecho podría permitir instalar el dispositivo de HSI en el campo o en la bodega, con el objetivo de obtener mayor información acerca de las madureces tecnológica y aromática de las bayas de Tempranillo Blanco, y así poder distinguir y dividir la uva en función de su calidad aromática.





# Monitorization of Varietal Aroma Composition Dynamics during Ripening in Intact *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco Berries by Hyperspectral Imaging

Sandra Marín-San Román, Juan Fernández-Navales,\* Cristina Cebrián-Tarancón, Rosario Sánchez-Gómez, Maria Paz Diago,\* and Teresa Garde-Cerdán\*

**Cite This:** *J. Agric. Food Chem.* 2023, 71, 2616–2627

**Read Online**

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

**ABSTRACT:** The measurement of aromatic maturity during grape ripening provides very important information for determining the harvest date, particularly in white cultivars. However, there are currently no tools that allow this measurement to be carried out in a noninvasive and rapid way. For this reason, in the present work, we have studied the use of hyperspectral imaging (HSI) to estimate the aromatic composition of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries during ripening. A total of 236 spectra in the VIS + short wave near-infrared (VIS+SW-NIR) range (400–1000 nm) of intact berries were acquired contactless under laboratory conditions. As gold standard values, a total of 20 volatile compounds were quantified by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), and the concentration of total soluble solids (TSS) was measured by refractometry. Calibration, cross-validation, and prediction models were built using partial least squares (PLS). Values of  $R^2_{CV} \geq 0.70$  were obtained for  $\alpha$ -terpineol, *p*-cymene,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, benzaldehyde, benzyl alcohol, hexanal, citral, linalool, 2-phenylethanol, octanoic acid, nonanoic acid, 2-hexenal, 2-hexen-1-ol, (Z)-3-hexen-1-ol, total C<sub>13</sub> norisoprenoids, total C6 compounds, total positive compounds (i.e., the sum of all families except C6 compounds), total benzenoids, and total soluble solids (TSS). Therefore, it can be affirmed that HSI in the VIS + SW-NIR range could be a good tool to estimate the aromatic composition of Tempranillo Blanco grape berries in a contactless, fast, and nondestructive way.

**KEYWORDS:** volatile compounds, partial least squares, total soluble solids, noninvasive, VIS+SW-NIR, TF-SPME

## 1. INTRODUCTION

The aromatic compounds that come from the grape, also called varietal aromas, are directly related to the quality of the wine, and therefore to its value.<sup>1–3</sup> The aromatic characterization of Spanish white grape varieties has been little studied, particularly that of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco.<sup>4</sup> This grapevine variety is a natural mutation of Tempranillo, grown since 2008 only in the Appellation d'Origine Contrôlée (A.O.C.) Rioja, and it is the second white variety (12%) grown in the A.O.C. Rioja in terms of surface area, after Viura (70%).<sup>4–6</sup>

Volatile compounds are found in grapes in concentrations ranging from ng/L to mg/L.<sup>7</sup> The study of these compounds is very important, as they are directly related to consumer acceptance or rejection<sup>8</sup> and to the higher or lower trueness to the type of varietal wine within a given viticultural region. Due to the low concentrations at which these compounds are found, sample preparation (extraction, preconcentration, fractionation, and/or isolation) is necessary prior to their chromatographic analysis.<sup>3,9</sup> These analytical methods are destructive, time-consuming, and require highly qualified personnel and very expensive specific equipment that can only be used in the laboratory and are generally not available in wineries.<sup>10,11</sup> For these reasons, the evolution of volatile compounds in the berries is not usually assessed throughout

the ripening process, which would provide the winemaker with a great deal of information to be able to make decisions regarding vineyard practices (e.g., defoliation around the fruiting zone to increase cluster sun exposure<sup>12</sup>), harvest date, prices according to the grape quality, allocation of the fermentation tank according to the aromatic characteristics of the grapes, etc.<sup>13</sup> In addition, in recent years, due to climate change, there has been a mismatch between technological maturity (mainly related to the total soluble solids, TSS) and phenolic and aromatic maturities.<sup>14–19</sup> As a result, berries are often harvested earlier (to avoid high alcohol contents and low acidities in resulting wines), and the adequate content of phenolic and aromatic compounds is not always achieved.<sup>20</sup> Because of this, rapid and nondestructive methods are being developed that link multivariate spectroscopic and chemical data to predict the concentration of specific chemical components.<sup>20,21</sup>

**Received:** October 27, 2022

**Revised:** January 13, 2023

**Accepted:** January 13, 2023

**Published:** January 26, 2023





In the last two decades, hyperspectral imaging (HSI) in the VIS (400–800 nm) and short wave near-infrared (SW-NIR) (800–1700 nm) regions has gained importance as a technology for nondestructive analysis in agricultural applications.<sup>22–25</sup> While conventional spectroscopy records the response of a small “spot” size, HSI collects the information as a set of images, with each image representing a narrow wavelength range.<sup>22,26</sup> Therefore, HSI combines two fields, the potential of spectroscopy modeling, with two-dimensional digital imaging, allowing specific regions of either the image and/or the spectrum to be selected, eliminating residual regions. In addition, the acquisition of hyperspectral images can be performed continuously, allowing large areas to be scanned rapidly.<sup>20,23,27</sup>

HSI has been used to estimate the amount, in grapes, of TSS,<sup>10,13,20,23,28–30</sup> anthocyanins,<sup>10,23,31,32</sup> amino acids,<sup>13</sup> tartaric acid, pH, malic acid, total phenols,<sup>10</sup> total iron-reactive phenolics, tannins,<sup>30,32</sup> the antioxidant activity, firmness, and hue angle.<sup>30</sup>

There is some work in which HSI has been applied to measure the amount of volatile compounds in single-roasted coffee beans,<sup>33</sup> in preserved eggs,<sup>34</sup> and in dry-cured pork.<sup>35,36</sup> However, to the best of our knowledge, the use of HSI to measure the amount of grape volatile compounds throughout ripening has not been addressed yet. Therefore, the objective of this study was to estimate the grape varietal aromatic composition and TSS of the Tempranillo Blanco variety throughout ripening using HSI, taking data from two vintages.

## 2. MATERIALS AND METHODS

**2.1. Materials and Reagents.** Chromatographic standards  $\alpha$ -terpineol, geraniol, linalool,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, benzaldehyde, 2-phenylethanol, benzyl alcohol, octanoic acid, decanoic acid, (E)-2-hexenal, hexanal, 1-hexanol, 2-hexen-1-ol, 2-octanol (internal standard, I.S.), and the reagent NaCl and ethanol (EtOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified through a Milli-Q system Millipore (Bedford, MA, USA).

Thin film (TF) with polydimethylsiloxane and carboxen (PDMS/CAR) (carbon fabric film thickness 450  $\mu$ m), liners packed with Tenax TA, and borosilicate magnetic stirrers were obtained from GERSTEL GmbH & Co (Mülheim an der Ruhr, Deutschland). The BP21 capillary column (50 m length, 0.25 mm i.d., and 0.25  $\mu$ m film thickness) was purchased from SGE (Ringwood, Australia).

Blender was bought from Philips (Amsterdam, Netherlands). The refractometer, oven, and six-position stirrer plates were purchased from Actylab (Logroño, La Rioja, Spain). Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) was purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The autosampler system consisted of a multipurpose sampler (MPS) equipped with a tube tray, a thermal desorption unit (TDU), and a cooled injection system (CIS-4) connected to a cryocooling system. MPS and automated TDU were provided from GERSTEL.

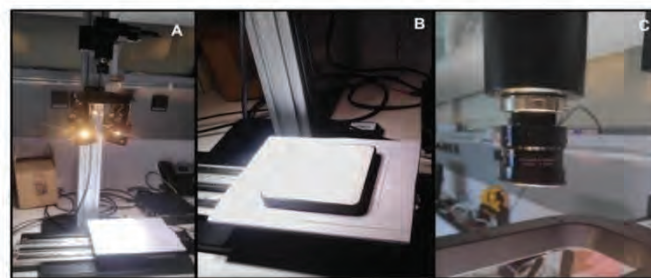
**2.2. Vineyards and Sampling.** The clusters of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco were hand-picked at random from two rows of a plot belonging to the Gobierno de La Rioja, located in Finca La Grajera (Logroño, La Rioja, Spain) (42°26′26.23″ North Latitude 2°30′51.25″ West Latitude; 447 m above sea level). They were collected, along the ripening period, during two vintages, 2019 and 2020. The vineyard was planted in 2002 following an East–West orientation. At planting, the grapevines were grafted onto 110 Richter rootstock, and they were trained to a vertically shoot-positioned system, with a spacing between rows and within the row of 3.00 m  $\times$  1.10 m, respectively, and with a plant density of 3030 plants/ha. During the 2019 vintage, from August to September (from veraison to post-harvest), clusters were harvested on five different dates: 08/12/2019, 08/19/2019, 08/26/2019, 09/02/2019, and 09/09/2019.

During the 2020 vintage, from July through September (from veraison to post-harvest), berry samples were collected along seven different dates: 29/07/2020, 05/08/2020, 12/08/2020, 19/08/2020, 26/08/2020, 09/02/2020, and 09/09/2020. At each date, 25 plastic bags were collected with 2–3 clusters of Tempranillo Blanco each. The clusters were frozen at  $-20$  °C until sample preparation.

**2.3. Sample Preparation.** All the clusters picked at a given date were manually destemmed, without defrosting, in a tray. Subsequently, all the berries were mixed in order to achieve the greatest homogeneity. Once homogenized, 64 berries were randomly taken and added to a bag. The process was replicated until 20 samples of 64 berries per date. Sixty-four berries were chosen because it is a multiple of 32, which is the number of berries needed to take the hyperspectral image and also allows to obtain enough must volume to analyze the volatile compounds. At the end of the process, 100 samples were obtained (5 dates  $\times$  20 samples/date) in 2019, and 140 samples (7 dates  $\times$  20 samples/date) in 2020, making a total of 240 samples pooling together the two vintages.

**2.4. Calibration Curves.** Calibration curves were obtained by the method optimized by Marin-San Román et al.<sup>37</sup> TF-SPME under 500 rpm stirring, for 6 h, at 20 °C. The standard solutions, which contained different concentrations of each of the compounds, were desorbed and analyzed in the GC–MS, performing three replicates of each one. The solutions were prepared in 50 mL of EtOH. The calibration curve of each compound involves a minimum of four points and a maximum of seven points of different concentrations. The compounds used and the  $R^2$  were as follows:  $\alpha$ -terpineol (0.9942), geraniol (0.9154), linalool (0.9643),  $\beta$ -damascenone (0.9684),  $\beta$ -ionone (0.9803), benzaldehyde (0.9684), 2-phenylethanol (0.9853), benzyl alcohol (0.9961), octanoic acid (0.9707), decanoic acid (0.9846), (E)-2-hexenal (0.9937), hexanal (0.9898), 1-hexanol (0.9706), and 2-hexen-1-ol (0.9748). The concentration of the volatile compounds, for which no calibration curve had been built, was calculated using the calibration curve of a compound of the same family, which was in a similar range of concentration. Likewise, for citral, the linalool curve was used; for *p*-cymene, the  $\alpha$ -terpineol curve was employed; for acetic, hexanoic, and nonanoic acids, the decanoic acid curve, and for 3-hexen-1-ol, the 2-hexen-1-ol curve was used.

**2.5. VIS + SW-NIR Hyperspectral Imaging.** Hyperspectral images were acquired under laboratory conditions using a push broom Resonon Pika L VIS–NIR hyperspectral imaging camera (Resonon, Bozeman, MA, USA) (Figure 1A). The spectral resolution



**Figure 1.** (A) Resonon Pika L VNIR hyperspectral imaging camera, (B) spectralon white reference, and (C) camera lens covered (dark reference acquisition).

of the camera was 2.1 nm (300 bands from 400 to 1000 nm), the amount of information captured by the sensor on each spatial line (column) of the hyperspectral image was 900 pixels, and the number of lines was 725. The integration time was set to 30 fps (33.33 ms each line). Therefore, the camera's time to generate an image was 24.16 s (33.33 ms  $\times$  725 lines). The height between the hyperspectral camera and the sample was set to 480 mm and the lighting setup included four 50 w halogen lamps. Prior to HSI, a Spectralon (Labsphere, Sutton, NH, USA) white reference (a surface with a reflectance over 95%) was manually placed at the same distance as the plates (fruit holder) where the berries were placed (Figure 1B). The



dark current was measured with the camera lens covered (Figure 1C). After that, for each of the 240 samples, previously defrosted, two hyperspectral images were acquired (two subsamples), with 32 berries for each one (Figure 2). In this way, the 64 berries composing each



**Figure 2.** Fruit holders with the first subsample of 32 berries, 16 on each plate, prior HSI.

sample were measured. Berry samples were naturally thawed at ambient temperature and they were carefully dried before measurement with HSI. Between samples, the plate was cleaned with paper to remove previous residues.

The raw camera information, acquired as luminous intensity, was translated into reflectance using eq 1.

$$R(\lambda) = \frac{G(\lambda) - D(\lambda)}{W(\lambda) - D(\lambda)} \quad (1)$$

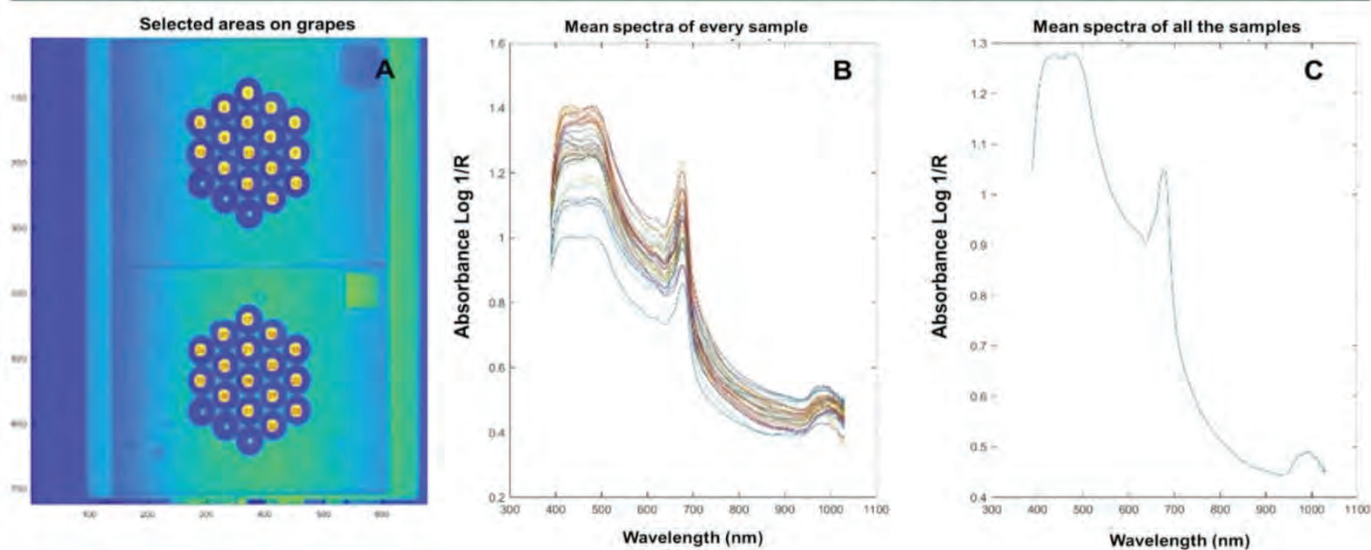
where  $\lambda$  is the wavelength (nm),  $G$  is the intensity of the light reflected by the berries (nm),  $W$  is the intensity of the light coming from the white reference (nm), and  $D$  is the dark reference (nm). Afterward, the reflectance ( $R$ ) was converted into absorbance [ $\log(1/R)$ ] (nm).

**2.6. Analysis of Volatile Compounds by TF-SPME and TSS by Refractometry.** For the extraction of volatile compounds, the method optimized in Marin-San Román et al.<sup>37</sup> was used with some modifications. The same 64 berries, from which the hyperspectral image was acquired, were triturated for 30 s in the blender. The paste obtained was introduced into a 50 mL Falcon, and centrifuged at 3900 rpm, for 15 min. An aliquot of 9 mL of centrifuged must sample, 25  $\mu$ L of the 2-octanol solution (5  $\mu$ L of 2-octanol/100 mL EtOH), and 2.5 g of NaCl were added in a 10 mL screw-capped vial. A

PDMS/CAR TF-SPME device was suspended in the screw-capped vial. A borosilicate magnetic stirrer was added. All samples were stirred at 500 rpm for 6 h at room temperature. After extraction, the TF-SPME device was removed, dried with a tissue paper, and then placed in an empty TDU tube with a glass wool plug at the base. The TDU tube was sealed with a transport adapter and placed in a 98 positions Twister rack on the MPS robotic for automated analysis. The volatile analysis was performed using an automated TDU.

The method used for the determination of the must volatile composition was based on that described by Sánchez-Gómez et al.<sup>38</sup> with some modifications adapted to the TF-SPME. TF were thermally desorbed in a stream of helium as carrier gas at a flow rate of 75 mL/min in the TDU in splitless desorption mode, increasing the temperature from 40 to 250 °C at a rate of 60 °C/min and holding at the final temperature for 5 min. The analytes were focused on a programmed temperature vaporizing injector (CIS-4), containing a Tenax TA-packed liner with 20 mg of Tenax and held at -40 °C with cryo cooling prior to injection. After desorption and focusing, the CIS-4 temperature was programmed from -40 to 230 °C at 12 °C/s and held at 230 °C for 5 min to transfer volatile compounds onto the analytical column. The CIS-4 operated in solvent vent mode (purge flow to split vent of 80 mL/min at 2 min, vent 60 mL/min, and pressure 20.85 psi).

The desorbed volatile compounds were separated in an Agilent 7890A gas chromatograph system (GC) coupled to a quadrupole Agilent 5975C electron ionization mass spectrometric detector, equipped with a fused silica capillary column (BP21 stationary phase, 30 m length, 0.25 mm I.D., and 0.25  $\mu$ m film thickness). The helium carrier gas had a constant column pressure of 20.75 psi. The oven temperature of GC was programmed at 40 °C (2 min), raised to 80 °C (5 °C/min, held for 2 min), then to 130 °C (10 °C/min, held for 5 min), then to 150 °C (5 °C/min, held for 5 min), and finally to 230 °C (10 °C/min, held for 5 min). The transfer line temperature was 235 °C. The MS operated in the scan mode (35–180 amu) with ionization energy set at 70 eV. To carry out the identification of each compound, the mass spectra obtained were compared with those of the NIST library and the chromatographic retention index of each standard. Compounds for which no standard was used were identified by comparing their mass spectra with the NIST library. To avoid matrix interferences, it was integrated by extraction ion chromatogram (EIC), isolating the target ion ( $m/z$ ) of each compound individually. The target ions ( $m/z$ ) were as follows: 41 for 2-hexenal; 43 for acetic acid; 45 for 2-octanol (I.S.); 56 for hexanal, and 1-hexanol; 57 for (E)-2-hexen-1-ol, and 2-ethyl-1-hexanol; 59 for  $\alpha$ -terpineol; 60 for



**Figure 3.** Hyperspectral image from 32 berries of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco placed on (A) two fruit holders with the ROIs selected, (B) average absorbance spectra of each berry, and (C) average absorbance spectrum of all berries.  $R$  is the reflectance value.



Table 1. Descriptive Statistics of 20 Volatile Compounds Content ( $\mu\text{g/L}$ ), the Total of Each Family Content ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) of Tempranillo Blanco Grape Berries<sup>a</sup>

compound	data set				calibration set				validation set						
	N	minimum	maximum	mean	SD	N	minimum	maximum	mean	SD	N	minimum	maximum	mean	SD
$\alpha$ -terpineol	232	0.022	5.41	0.70	1.15	185	0.022	5.41	0.72	1.18	47	0.024	3.24	0.64	1.03
citral	229	1.24	301.19	34.40	52.84	184	1.24	301.19	36.23	55.72	45	2.80	176.32	26.92	38.50
geraniol	169	0.12	76.85	2.41	6.95	132	0.12	76.85	2.61	7.75	37	0.22	11.90	1.69	2.41
linalool	223	0.33	29.08	3.16	4.53	178	0.33	29.08	3.25	4.67	45	0.44	18.65	2.79	3.93
p-cymene	234	0.032	17.92	0.98	2.33	187	0.032	17.92	1.02	2.47	47	0.038	7.36	0.85	1.70
total terpenoids	234	0.69	333.74	40.09	58.66	187	0.69	333.74	75.15	91.81	47	1.23	204.47	31.27	42.59
C <sub>13</sub> norisoprenoids															
$\beta$ -damascenone	230	0.0006	9.63	0.59	1.30	185	0.0006	9.63	0.56	1.27	45	0.0009	6.63	0.70	1.42
$\beta$ -ionone	234	0.0013	0.59	0.044	0.081	187	0.0013	0.59	0.044	0.082	47	0.0024	0.35	0.044	0.077
total C <sub>13</sub> norisoprenoids	234	0.0026	10.22	0.62	1.36	187	0.0026	10.22	0.60	1.34	47	0.0035	6.98	0.71	1.47
Benzeneoids															
benzaldehyde	231	0.14	10.29	1.69	1.87	185	0.14	10.29	1.71	1.91	46	0.21	6.79	1.59	1.71
2-phenylethanol	234	7.07	330.70	60.90	73.96	187	7.07	330.70	61.76	76.28	47	10.45	318.89	57.47	64.52
benzyl alcohol	233	1.30	90.35	11.79	14.60	186	1.30	90.35	11.75	14.63	47	1.74	77.52	11.95	14.62
total benzeneoids	234	9.09	401.78	74.31	89.43	187	9.09	393.11	75.15	91.81	47	12.54	401.78	70.97	80.07
Fatty acids															
acetic acid	234	1.05	221.49	19.09	21.93	187	1.05	221.49	20.03	23.61	47	2.17	48.83	15.32	12.80
hexanoic acid	234	0.59	153.97	10.27	19.84	187	0.59	153.97	11.02	20.97	47	0.77	96.68	7.25	14.26
octanoic acid	234	0.18	17.59	1.87	2.46	187	0.18	17.59	1.91	2.60	47	0.19	7.20	1.73	1.79
nonanoic acid	234	0.053	5.82	0.47	0.61	187	0.053	5.82	0.46	0.62	47	0.11	2.71	0.51	0.57
decanoic acid	172	0.025	3.56	0.15	0.34	137	0.025	3.56	0.15	0.34	35	0.041	1.90	0.18	0.33
total fatty acids	234	1.91	308.92	31.69	38.68	187	1.91	308.92	33.42	41.29	47	4.77	142.15	24.80	24.93
C6 compounds															
2-hexenal	234	19.11	2137.39	274.01	366.20	187	19.11	2137.39	275.28	369.42	47	26.73	1599.21	268.97	356.94
hexanal	234	10.17	3693.21	382.46	590.60	187	10.17	3693.21	373.40	587.16	47	14.56	3344.03	418.57	609.18
1-hexanol	234	18.25	882.20	141.40	108.82	187	18.25	882.20	135.14	102.27	47	28.26	640.62	166.29	130.00
2-hexen-1-ol	182	23.95	7964.66	1032.63	1212.08	144	23.95	7964.66	998.03	1213.56	38	39.75	5029.11	1163.78	1213.52
(z)-3-hexen-1-ol	233	38.77	7680.73	914.07	1098.23	187	38.77	7680.73	899.52	1077.25	46	93.62	6455.88	973.21	1190.42
total c6 compounds	234	344.05	14881.10	2511.20	2392.30	187	344.05	14881.10	2451.86	2363.40	47	543.15	11236.81	2747.27	2516.36
total positive compounds	234	17.53	784.05	146.71	155.02	187	17.53	784.05	151.48	162.25	47	25.29	503.39	127.76	121.77
TSS	236	11.30	24.90	19.47	3.37	188	11.30	24.90	19.41	3.41	48	12.20	24.50	19.67	3.24

<sup>a</sup>N: number of samples in which each compound had been detected; SD: standard deviation; TSS: total soluble solids; total positive compounds: The sum of all families except C6 compounds.



**Table 2.** Calibration, Cross-Validation, and External Prediction Results for the VIS + SW-NIR Models of Volatile Compounds Content ( $\mu\text{g/L}$ ), the Total of Each Family Content ( $\mu\text{g/L}$ ), and Total Soluble Solids ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) in Tempranillo Blanco Grape Berries<sup>a</sup>

compounds	spectral treatment	N	mean	SD	PLS factor	calibration		cross-validation			external prediction	
						SEC	$R_C^2$	SECV	$R_{CV}^2$	RPD	SEP	$R_p^2$
Terpenoids												
$\alpha$ -terpineol	Snv-DT + D2WS	147	0.31	0.70	10	0.097	0.98	0.13	0.97	5.38	0.57	0.77
citral	D2WS	143	17.01	20.48	10	5.87	0.92	7.72	0.86	2.65	28.72	0.46
linalool	Snv-DT + D2WS	148	1.97	2.73	10	0.86	0.90	1.08	0.84	2.53	3.57	0.25
<i>p</i> -cymene	D1WS	133	0.16	0.24	11	0.062	0.93	0.092	0.90	2.61	1.63	0.25
total terpenoids	D1WS	133	17.51	8.71	8	4.11	0.78	5.01	0.69	1.74	40.23	0.22
C <sub>13</sub> norisoprenoids												
$\beta$ -damascenone	D2WS	148	0.12	0.40	11	0.080	0.96	0.11	0.94	3.63	1.20	0.53
$\beta$ -ionone	D2WS	143	0.018	0.034	11	0.0053	0.98	0.007	0.96	4.85	0.047	0.78
total C <sub>13</sub> norisoprenoids	D2WS	151	0.17	0.49	11	0.091	0.97	0.12	0.94	4.08	1.16	0.63
Benzenoids												
benzaldehyde	Snv-DT + D2WS	149	1.12	1.25	9	0.27	0.95	0.34	0.93	3.68	1.01	0.66
2-phenylethanol	D2WS	144	29.33	27.78	9	8.22	0.91	10.88	0.87	2.55	62.87	0.16
benzyl alcohol	D2WS	151	7.37	8.94	11	1.98	0.95	2.40	0.93	3.73	12.22	0.34
total benzenoids	Snv-DT + D2WS	153	45.62	53.51	11	13.74	0.93	19.14	0.89	2.79	72.88	0.26
Fatty acids												
hexanoic acid	D2WS	144	3.82	3.17	8	1.47	0.78	1.79	0.68	1.77	14.07	0.16
octanoic acid	Snv-DT + D2WS	142	0.91	0.51	6	0.23	0.80	0.25	0.76	2.04	1.69	0.31
nonanoic acid	Snv-DT + D1WS	149	0.27	0.16	10	0.072	0.80	0.084	0.73	1.90	0.57	0.13
decanoic acid	Snv-DT + D2WS	120	0.079	0.035	3	0.019	0.68	0.021	0.64	1.67	0.32	0.11
total fatty acids	D1WS	151	18.84	11.40	5	8.80	0.40	10.38	0.30	1.10	24.15	0.083
C6 compounds												
2-hexenal	Snv-DT + D2WS	153	146.65	100.28	8	33.77	0.89	40.38	0.84	2.48	313.90	0.58
hexanal	D1WS	163	244.70	170.48	11	44.43	0.93	51.98	0.91	3.27	561.47	0.21
1-hexanol	D2WS	175	119.80	72.47	9	40.20	0.69	46.69	0.58	1.55	116.53	0.29
2-hexen-1-ol	D1WS	122	693.44	697.93	8	237.78	0.89	266.38	0.85	2.62	749.38	0.72
(Z)-3-hexen-1-ol	D2WS	171	723.64	715.37	10	220.45	0.91	270.45	0.86	2.65	748.80	0.66
total C6 compounds	Snv-DT + D2WS	160	1854.12	1511.78	11	385.93	0.93	467.21	0.90	3.23	1804.67	0.60
total positive compounds	Snv-DT + D2WS	162	118.16	127.74	11	28.66	0.95	36.13	0.92	3.54	80.80	0.68
TSS	D1WS	169	19.57	3.44	9	0.38	0.99	0.42	0.98	8.19	1.03	0.91

<sup>a</sup>Snv-DT: standard normal variate plus detrending; DnWm: Savitzky–Golay filter with “*n*”-degree derivative, window size of “*m*”; N: number of samples were the ones used for calibration and cross-validation models after chemical outlier detection ( $t > 2.5$ ); SD: standard deviation; SEC: standard error of calibration;  $R_C^2$ : determination coefficient of calibration; SECV: standard error of cross-validation;  $R_{CV}^2$ : determination coefficient of cross-validation; RPD: residual predictive deviation; SEP: standard error of prediction;  $R_p^2$ : determination coefficient of prediction. TSS: total soluble solids. Total positive compounds: the sum of all families except C6 compounds.

hexanoic, octanoic, nonanoic, and decanoic acids; 67 for (Z)-3-hexen-1-ol; 69 for citral,  $\beta$ -damascenone, and geraniol; 71 for linalool; 77 for benzaldehyde; 79 for benzyl alcohol; 91 for 2-phenylethanol; 119 for *p*-cymene; and 177 for  $\beta$ -ionone. Quantification was based on the calibration curves of the respective standards.

The TSS values were measured with the refractometer, adding a few drops of the centrifuged must (15 min, 3900 rpm) and expressed as  $^{\circ}\text{Brix}$ .

**2.7. Spectral Data Analysis.** For each hyperspectral image composed of 32 berries placed on two fruit holders, an automated code programmed in Matlab allowed selecting regions of interest (ROI) concerning each one of the 32 berries using a diameter of 7 mm per berry (Figure 3A). The ROIs were extracted and used to calculate the average spectrum of each berry (Figure 3B) and the average of all the berries (Figure 3C) placed on the two fruit holders.

Simultaneously, the mean of the pixels comprised in each berry ROI was plotted (Figure 3B) to ensure that the spectral variability remained very similar to the average spectrum of all berries (Figure 3C). Finally, the average spectrum of each sample was composed of two subsamples.

The WinISI II software package version 1.50 (Infrasoft International, PortMatilda, PA, USA) was used for spectral data processing and statistical analysis of hyperspectral images. In a first step, the spectral data were pretreated with standard normal variate (SNV) and detrending to remove the effects of scattering, and to compensate for the baseline offset.<sup>39</sup> As a second step, the Savitzky–Golay smoothing and derivative process was applied, testing different values for the window size, as well as the first and second derivatives.<sup>40</sup>

In order to explore the data structure, to visualize the presence of outlier spectra, and to identify the main sources of variability in the



spectra, a principal component analysis (PCA) was performed with the averaged spectrum of each sample. PCA is an unsupervised pattern recognition technique to provide information about the latent structure of the spectral matrix and to find spectral differences among all spectral samples.<sup>41,42</sup> Modified partial least squares (MPLS) regression was used for the prediction of the individual and families of the volatile compounds and TSS using the spectra acquired on intact grape berries in the VIS+SW-NIR range 400–1000 nm. The calibration data set was used to train the model, and statistics of calibration and cross-validation, using a fourfold cross-validation approach (to prevent overfitting), were computed to assess the performance of the built models. The validation data set was never used in the training process and was employed for testing with external samples, also called external prediction.

Chemical outliers were eliminated in this process, based on their value in the Student's *t*-statistic. This statistic indicates the difference between the reference value and the predicted value. A critical limit of  $t > 2.5$  was used to identify samples as chemical outliers.<sup>43</sup> The Studentized residuals from the regression models fitted using least squares is a very common approach to identifying discordant observations in linear regression problems.<sup>44</sup> In order to train robust models, capable of predicting totally unknown samples, the original data set, with 236 samples (4 samples' spectra were lost), was divided into two independent data sets: a calibration set, consisting of 80% of the randomly assigned samples (188 samples), and a validation set, consisting of the remaining 20% (48 samples) (Table 1). Each set included samples that were appropriately distributed and covered the entire range of the volatile compound's concentration and TSS content. Although the same number of samples were used for the data set (236), for the calibration set (188), and for the validation set (48), not all the compounds could be found in all of them, so the *N* changes for each compound or family (Table 1). Calibration accuracy depends on the standard error of cross-validation (SECV) and standard error of prediction (SEP) used for internal validation or external prediction, respectively. The number of latent variables and determination coefficients of calibration, cross-validation, or external prediction ( $R_C^2$ ,  $R_{CV}^2$ , and  $R_P^2$ , respectively) to represent the proportion of explained variance of the response variables were also computed. The optimal number of latent variables (LVs) was selected as the one yielding the lowest standard error of cross-validation (SECV). Additionally, the residual predictive deviation (RPD), calculated as the ratio between the standard deviation (SD) of the reference data for the training set and the SECV, was also considered (Table 2).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. Volatile Composition of Grape Berries.** A total of 20 volatile compounds were identified and quantified in grape berries by GC–MS. Table 1 shows the maximum and minimum, mean, and standard deviation (SD) values for each volatile compound and the TSS in Tempranillo Blanco grape berries. Volatile compounds and TSS were measured from veraison to post-harvest, covering a wide range of concentrations and °Brix, respectively. A total of five terpenoids, two  $C_{13}$  norisoprenoids, three benzenoids, five fatty acids, and five C6 compounds were identified. As it can be seen in Table 1, the content of volatile compounds ranged from 0.0006  $\mu\text{g/L}$  for  $\beta$ -damascenone to 7964.66  $\mu\text{g/L}$  for 2-hexen-1-ol.

Terpenoids and  $C_{13}$  norisoprenoids are two of the families that contribute most to grape varietal aroma, due to their low perception thresholds.<sup>45</sup> Terpenoids contribute to the floral and fruity aroma.<sup>46</sup>  $C_{13}$  norisoprenoids, especially  $\beta$ -damascenone, are correlated with fruity aromas.  $\beta$ -Ionone contributes to the violet aroma.<sup>47</sup>

Benzenoids are found in very low concentrations in grapes, like most volatile compounds, but contribute significantly to wine aroma.<sup>48</sup> As it can be seen in Table 1, 2-phenylethanol is

the most abundant benzenoid. This compound is related to the rose aroma descriptor.<sup>49</sup>

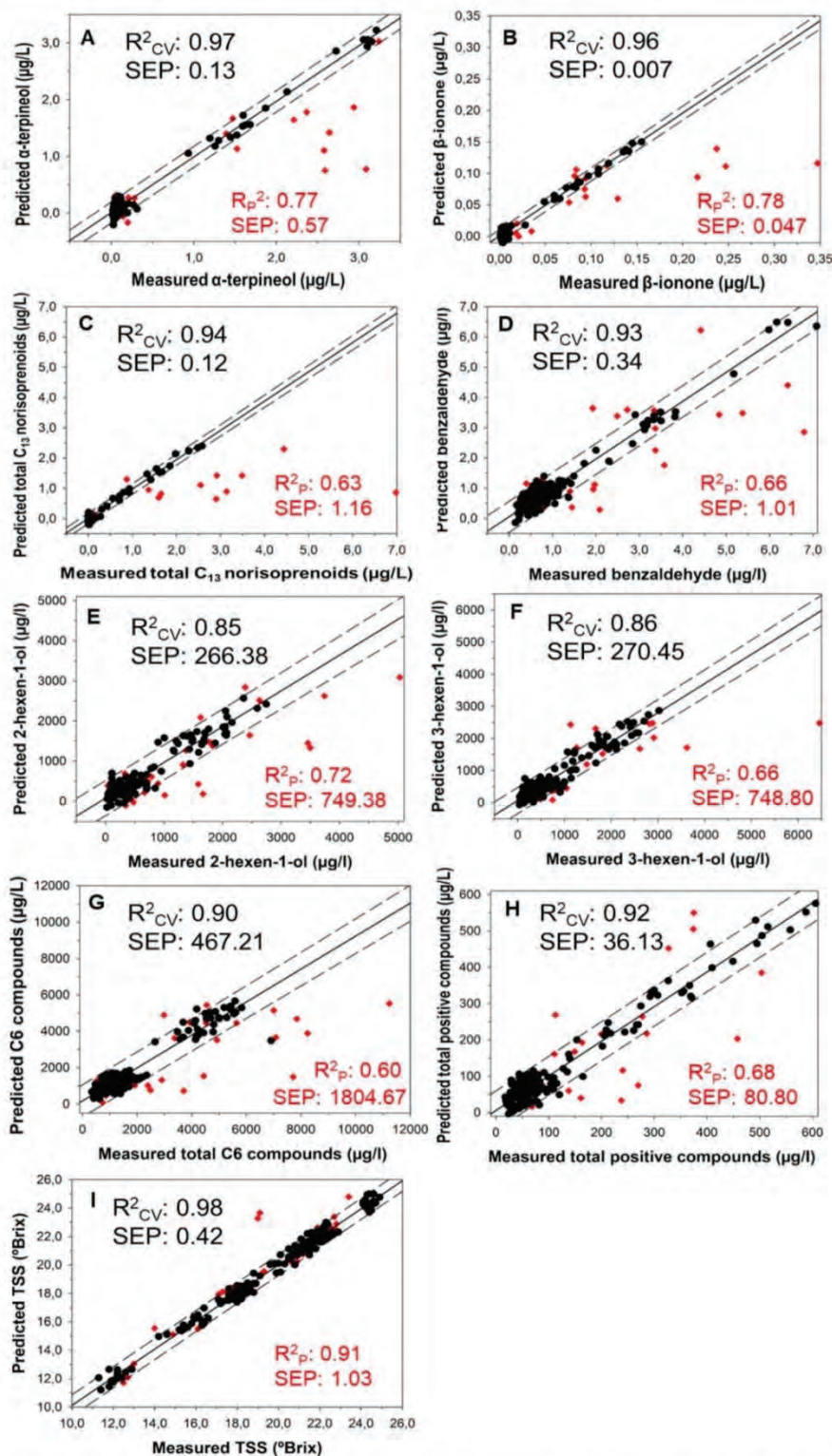
It can be observed that the most abundant compounds, in general, were the C6 compounds. This result is consistent with the majority of studies on volatile compounds in grape berries,<sup>50–52</sup> and particularly in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco grape berries as well.<sup>5,53</sup> C6 compounds are known as “green leaf volatiles” and contribute negatively to wine aroma.<sup>8</sup> However, since C6 compounds have very high perception thresholds, they have little impact on the final aromatic perception.<sup>47</sup>

Regarding the TSS, the minimum was 11.30 °Brix, which is characteristic of grapes in a phenological stage near veraison, and the maximum was 24.90 °Brix, characteristic of overripe berries of the white variety. It can be observed that the standard deviation (SD) of the compounds was very high, and this is due to the difference between the ripening stages of the fruit. The fact of carrying out such a wide and representative sampling has allowed us to obtain a very robust model. In Table 1, it can be observed that the number of samples (*N*) for each compound was different; this is because not all the compounds were present in all the chromatograms (*N* = 236).

**3.2. Spectra Analysis.** An example of the hyperspectral image from 32 berries of Tempranillo Blanco placed on two fruit holders with the ROIs selected is shown in Figure 3A. In the spectra, three absorption peaks at around 450, 500, and 680 nm can be identified in the visible range. While the first two can be related to the presence of some flavonoids and phenolic compounds bringing the brown-yellowish color to the resulting wines, the peak around 680 is often linked to chlorophyll.<sup>54</sup> In the NIR region, a wide absorption peak at 976 nm can be clearly observed. This is usually assigned to the second O–H stretch overtone<sup>55</sup> and related to water absorption. Since grape berries have a high water content, it is often the case that water bands dominate the spectrum in the NIR region.<sup>56</sup> Must compounds are present in their structure functional groups with O–H, N–H, and C–H bonds, which are responsible for these absorption peaks, so it is feasible that they may relate to the volatile compounds present in berries. Similar spectral properties have been observed in a previous work in which grape mash samples of different grapevine varieties were analyzed for their aroma compounds using NIR spectroscopy.<sup>56</sup> With regard to the individual aroma compounds and their families, several absorption maxima can be observed in pure signature spectra. However, in complex matrices, such as those from grape berries, they cannot be linked solely to aroma constituents because water, sugars, and acids, which are in much higher concentrations in grape berries, often exhibit the same functional groups.

**3.3. Chemometric Techniques.** Table 2 shows the mathematical pretreatments that provided the best results for calibration (C), cross-validation (CV), and prediction (P) for each of the volatile compounds, as well as for the TSS. As shown in Table 1, the standard deviation (SD) of the volatile compounds was higher than the mean because the grapes were harvested at different ripening times in order to obtain a wide range of both volatile compounds and TSS. Svn-DT means standard normal variate plus detrending. DnWm: Savitzky–Golay filter with an *n*-degree derivative, window size of *m*. Volatile compounds whose  $R_{CV}^2$  value was greater than 0.30 were included since  $R^2$  values between 0.30 and 0.50 are considered to provide good separation between high and low values.  $R^2$  values between 0.50 and 0.70 provide good





**Figure 4.** Regression plots for volatile compounds determination using the best PLS prediction models in the VIS + SW-NIR range: (A)  $\alpha$ -terpineol; (B)  $\beta$ -ionone; (C) total  $C_{13}$  norisoprenoids; (D) benzaldehyde; (E) 2-hexen-1-ol; (F) (Z)-3-hexen-1-ol; (G) total C6 compounds; (H) total positive compounds; and (I) Total Soluble Solid (TSS). Black color: samples of fourfold cross-validation; correlation line: solid line; prediction intervals: dashed lines. Red color: samples of external prediction.

separation between high, medium, and low values.  $R^2$  values between 0.70 and 0.90 are considered a good adjustment, and, finally,  $R^2$  values  $\geq 0.90$  provide an excellent adjustment.<sup>43</sup> The  $R^2$  of a set of samples depends mainly on how those samples

are distributed within the set. For this reason, the main difference between  $R^2_{CV}$  and  $R^2_p$  is the variability of the data from the calibration set and from the validation set, respectively. As the samples from the validation set were



randomly selected and they were far fewer than those from the calibration set, they were not uniformly distributed over the entire range of concentrations, which is why  $R_p^2$  decreases, and there is such a difference with  $R_{CV}^2$ .

In Table 2, N means that the number of samples were the ones used for calibration and cross-validation models after chemical outlier detection (eliminating the samples that had  $t > 2.5$ ). The elimination of outliers reduced the range of concentrations covered by the models, leaving out of this range some samples of the validation set (destined for external prediction). This caused a decrease in the prediction accuracy of samples outside this range, increasing the SEP.

The TSS provided a  $R_{CV}^2 \geq 0.90$ , as well as the volatile compounds  $\alpha$ -terpineol, *p*-cymene,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, benzaldehyde, benzyl alcohol, and hexanal, and families of compounds total C<sub>13</sub> norisoprenoids, total C6 compounds, and total positive compounds (the sum of all families except C6 compounds). These families are determinant in the quality and typicality of the wine because the C<sub>13</sub> norisoprenoids have very low perception thresholds, so their contribution to aroma is important, and C6 compounds, in high concentrations, contribute negatively to wine aroma.<sup>50,51,57</sup> For this reason, it is important to find a tool to estimate the concentration of these compounds in grapes before harvesting, to be able to adjust the date of harvest, so the results obtained are very promising. On the other hand, citral, linalool, 2-phenylethanol, octanoic acid, nonanoic acid, 2-hexenal, 2-hexen-1-ol, and (Z)-3-hexen-1-ol, as well as the total benzenoids provided values of  $R_{CV}^2$  between 0.70 and 0.90. For all the families and compounds that present a  $R_{CV}^2 \geq 0.70$ , a quantitative prediction can be made, which would allow an accurate estimation of the content of these compounds in the grapes. The remaining compounds and families presented values of  $R_{CV}^2$  between 0.50 and 0.69, except for the total fatty acids ( $R_{CV}^2 = 0.30$ ). In the work of Caporaso et al.,<sup>33</sup> in which they estimate the volatile compounds in coffee using HSI, it can also be observed how, in general, the acid models yielded lower  $R_{CV}^2$  values than the average of the rest of the volatile compounds. As for the content of volatile compounds, there is only one study that estimates volatile compounds in white grapes (Albariño).<sup>58</sup> However, in this work, 14 samples of white grapes were used, and the authors did not perform cross-validation or external prediction, so the results obtained in that work cannot be compared with those obtained in the present one. Nevertheless, a very recent work<sup>56</sup> analyzed grape mash samples from more than 15 grapevine varieties (red and white) grown in Germany using on-line NIR spectroscopy and reported  $R_{CV}^2$  values ranging from 0.30 to 0.90 for a series of aroma compounds. Although the aroma profiles reported in the present work and in the German work differ in many compounds, some of them (e.g. linalool, 2-hexenal, 1-hexanol...) can be found in both, and the performance metrics of cross-validation models in these two studies can be compared. Likewise, the  $R_{CV}^2$  values for linalool (above 0.84) and 1-hexanol (around 0.58) are very similar in both studies, while the SECV values in the present work were smaller (Table 2) than those in the German study. In terms of the RPD, models for most aroma compounds exhibited RPD values around  $\sim 1.5$  in the German work, and between 1.1 and 5.38, with a median value of 2.63 in this study. The RPD indicates the precision behavior of the prediction in comparison with the average composition of all the samples. For this metric, it is usually accepted that models with an RPD smaller than 1.5 are

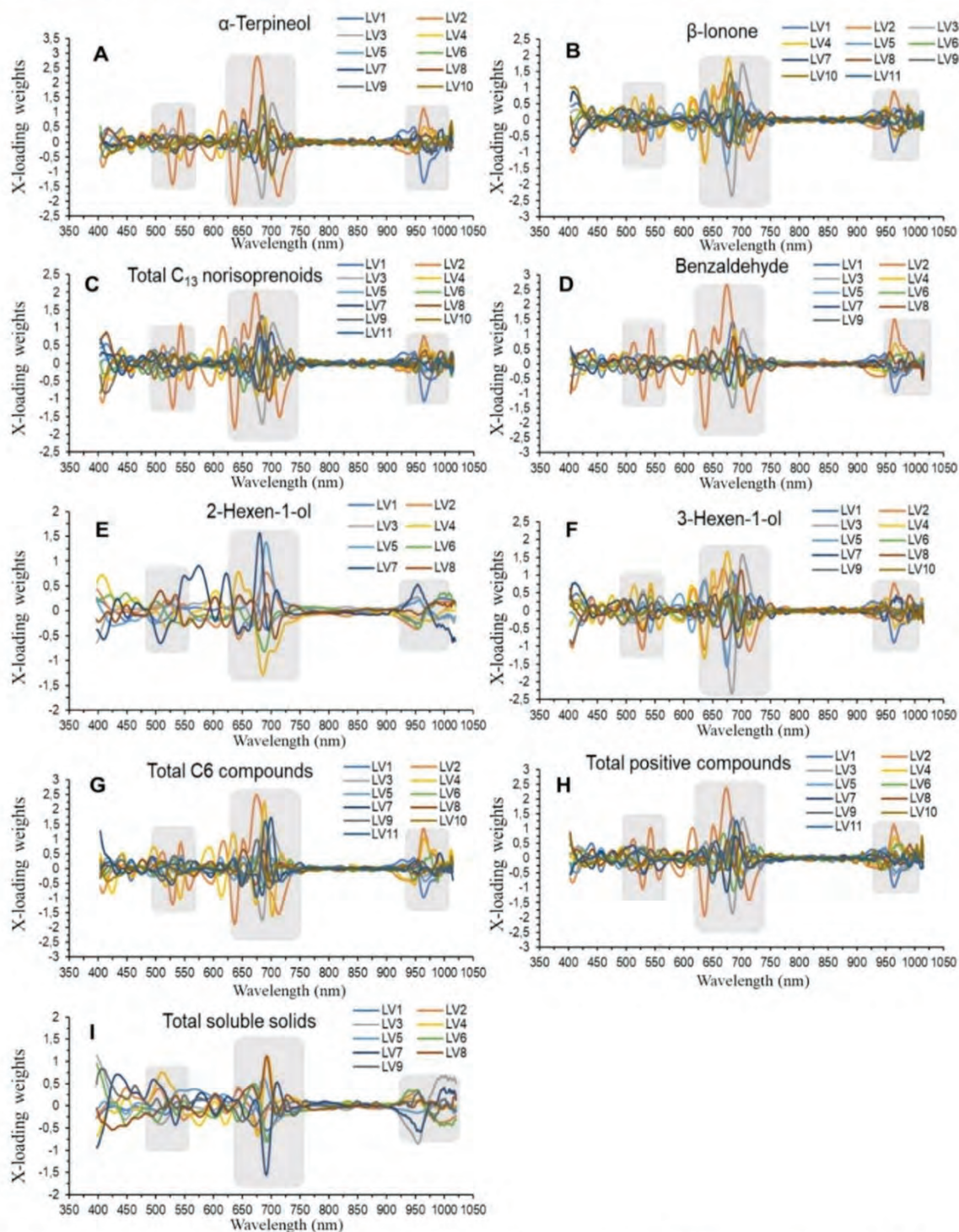
not suitable while those showing RPD values between 1.5 and 2.0 are suitable for differentiating the variability of the data and models while RPDs greater than 2.0 exhibit a very good predictive performance which can be considered excellent when RPDs exceed 3.0.<sup>59</sup> It can be seen in Table 2 that several compounds have an RPD value greater than 3. Volatile compounds are found in very low concentrations in grapes, so finding a model that allows estimating their concentration throughout ripening, and even quantifying them, was of great difficulty. This fact adds great value to the results obtained in this work.

According to the performance metrics of the present work, the results obtained indicate that there is a possibility of classifying berries according to their high, low, and medium content of these volatile compounds, which could be of considerable benefit to the wine industry. If this equipment is placed in the field, it would be possible to estimate the harvest date based on the aromatic composition of the Tempranillo Blanco grapes, which was not possible until now. On the other hand, if installed in the winery, it would allow classifying the berries into various categories and adding them to different fermentation tanks, looking for different aromatic profiles or wine styles. The values of SECV and SEP were in the range of 0.007–270.45  $\mu\text{g/L}$  and 0.047–749.38  $\mu\text{g/L}$ , respectively, being the minimum SECV and SEP values for  $\beta$ -ionone, the maximum SECV for (Z)-3-hexen-1-ol, and the maximum SEP for 2-hexen-1-ol. The standard error (SE) of a set of samples is proportional to the difference between the reference value and the predicted value and inversely proportional to the total number of samples in the set. For this reason, there is a difference between the SECV and the SEP because the difference between the reference and predicted values is higher in the external prediction than in the cross-validation, and in addition, the number of samples is lower in the external prediction than in the cross-validation, which increases the SEP, with respect to the SECV. The PLS factor ranged from 3 to 11 and the RPD value ranged from 1.10 to 8.19.

Figure 4 shows the best prediction models for specific volatile compounds in the VIS+SW-NIR: 400–1000 nm spectral range. To facilitate the interpretation of the results (i.e., that is to show a good distribution of data along the regression line), it was decided to plot the chemical families presenting a  $R_p^2 \geq 0.60$ . The prediction samples (red color) have been plotted together with the calibration model (black color) to facilitate their interpretation. Black samples correspond to the samples used to perform the calibration models (4-fold cross-validation). The number of samples was (Table 2) 147 for  $\alpha$ -terpineol, 143 for  $\beta$ -ionone, 151 for total C<sub>13</sub> norisoprenoids, 149 for benzaldehyde, 122 for 2-hexen-1-ol, 171 for (Z)-3-hexen-1-ol, 160 for total C6 compounds, and 162 for total positive compounds. Red samples correspond to the samples of the validation set, used for external prediction (Table 1).

Considering the large number of samples used to carry out the calibration models (black color), as shown in Figure 4, it can be seen that, for represented volatile compounds, most samples are located in the lowest concentration range (as is normal for volatile compounds in grapes), with a very small number of samples found in higher concentration ranges. This is the reason why the models make the greater error, when making the external prediction (red color), in the samples that are located in the highest concentration ranges. This fact is very well observed in Figure 4A–D where the external





**Figure 5.** Loading weight plots for all latent variables (LV) of each volatile compounds and TSS determination using the best PLS prediction models in the VIS + SW-NIR range. (A)  $\alpha$ -terpineol; (B)  $\beta$ -ionone; (C) total C<sub>13</sub> norisoprenoids; (D) benzaldehyde; (E) 2-hexen-1-ol; (F) (Z)-3-hexen-1-ol; (G) total C<sub>6</sub> compounds; (H) total positive compounds; and (I) TSS. Gray areas indicate the highest loading weights.

prediction samples, with the highest concentrations, fall outside the prediction intervals (dashed lines).

On the other hand, as it can be seen in Table 2, for the TSS, 169 samples were used to perform the cross-validation model (black color). In Figure 4, it can be seen how the samples are more uniformly distributed; this is because the sampling was done at different times of ripening, thus covering a wide range

of °Brix. This is the reason why the external prediction comes out so well, with almost all the samples within the prediction intervals (dashed lines). In the case of the TSS, which is the classical and most well-known grape maturity parameter, values of  $R_p^2 = 0.91$  and  $SEP = 1.03$  were obtained, with RPD well above 3.0 (8.19, Table 2), clearly demonstrating the possibility of accurately estimating this variable using noninvasive HSI.



TSS has been studied by HSI in red grapes.<sup>10,23,60–62</sup> Good results were obtained in all of them, with good correlations and RPD between 1 and 4. On the other hand, there is a study in which HSI is used to estimate the TSS in red grapes and white grapes. In this work they obtained, in white grapes, an RSQ of 0.95, an SECV of 1.10, and an SEP of 1.89.<sup>63</sup>

Additionally, the loadings for the best PLS prediction models of volatile compounds and TSS, for VIS+SW-NIR: 400–1000 nm spectral range, are plotted in Figure 5. It can be seen how the wavelengths showing the highest weights of the LVs are mainly located in two zones in the visible range, between 500–550 and 600–700 nm, and one zone in the NIR range, between 925 and 1000 nm, the latter usually assigned to the second O-H stretch overtone.

Overall, this novel approach (which is solvent-free, non-invasive, and carried out in intact berries) estimation of grape aroma compounds using HSI can be performed either in-field or at the reception area of wineries for an upgraded characterization of the grape composition and maturity in Tempranillo Blanco. Notwithstanding, it could also be adapted to other cultivars, particularly for the production of super premium wines, in which their quality distinction is not solely made based on TSS or acidity.

In conclusion, a tool has been developed to estimate the aromatic composition and TSS of Tempranillo Blanco grapes in a noninvasive form, using hyperspectral imaging. The results show that the model allows differentiating between high, medium, and low values in all families and compounds, except for total fatty acids. The model also allows quantification of TSS, as well as the content of  $\alpha$ -terpineol, *p*-cymene,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, benzaldehyde, benzyl alcohol, hexanal, citral, linalool, 2-phenylethanol, octanoic acid, nonanoic acid, 2-hexenal, 2-hexen-1-ol, (*Z*)-3-hexen-1-ol, total C<sub>13</sub> norisoprenoids, total C<sub>6</sub> compounds, total positive compounds, and total benzenoids in Tempranillo Blanco grapes during the ripening process. The model obtained allows predicting technological maturity and aromatic maturity simultaneously at different stages of grape ripening.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Authors

**Juan Fernández-Navales** – Grupo TELEVITIS, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de La Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja), 26007 Logroño, Spain; Email: [juan.fernandezn@unirioja.es](mailto:juan.fernandezn@unirioja.es)

**María Paz Diago** – Grupo TELEVITIS, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de La Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja), 26007 Logroño, Spain; Email: [maria-paz.diago@unirioja.es](mailto:maria-paz.diago@unirioja.es)

**Teresa Garde-Cerdán** – Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), 26007 Logroño, Spain; [orcid.org/0000-0002-2054-9071](https://orcid.org/0000-0002-2054-9071); Phone: +34 941 894980; Email: [teresa.garde.cerdan@csic.es](mailto:teresa.garde.cerdan@csic.es); Fax: +34 941 899728

### Authors

**Sandra Marín-San Román** – Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), 26007 Logroño, Spain

**Cristina Cebrián-Tarancón** – Cátedra de Química Agrícola, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Departamento de Ciencia y

Tecnología Agroforestal y Genética, Universidad de Castilla-La Mancha, 02071 Albacete, Spain

**Rosario Sánchez-Gómez** – Cátedra de Química Agrícola, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, Universidad de Castilla-La Mancha, 02071 Albacete, Spain

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.2c07425>

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was given by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades under the project RTI2018-096549-B-I00. S.M.-S.-R. thanks Gobierno de La Rioja for her predoctoral contract.

## REFERENCES

- (1) Aleixandre-Tudo, J. L.; Weightman, C.; Panzeri, V.; Nieuwoudt, H. H.; Du Toit, W. J. Effect of Skin Contact before and during Alcoholic Fermentation on the Chemical and Sensory Profile of South African Chenin Blanc White Wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2015**, *36*, 366–377.
- (2) Gambetta, J. M.; Bastian, S. E. P.; Cozzolino, D.; Jeffery, D. W. Factors Influencing the Aroma Composition of Chardonnay Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6512–6534.
- (3) Marín-San Román, S.; Rubio-Bretón, P.; Pérez-Álvarez, E. P.; Garde-Cerdán, T. Advancement in Analytical Techniques for the Extraction of Grape and Wine Volatile Compounds. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, No. 109712.
- (4) Martínez, J.; Rubio-Bretón, P.; Eva Vicente, M.; García-Escudero, E.; Sociedad Aragonesa de Gestión Agroambiental, S.L.U. (SARGA). Enrique García-Escudero, y. Influencia Del Terroir En El Perfil Aromático de Tempranillo Blanco En La D.O.Ca. Rioja. *E3S Web Conf.* **2018**, *50*, No. 02003.
- (5) Garde-Cerdán, T.; da Costa, N. L.; Rubio-Bretón, P.; Barbosa, R.; Baroja, E.; Martínez-Vidaurre, J. M.; Marín-San Román, S.; Sáenz de Urturi, I.; Pérez-Álvarez, E. P. The Most Important Parameters to Differentiate Tempranillo and Tempranillo Blanco Grapes and Wines through Machine Learning. *Food Anal. Methods* **2021**, *14*, 2221–2236.
- (6) Garde-Cerdán, T.; Rubio-Bretón, P.; Marín-San Román, S.; Baroja, E.; Sáenz de Urturi, I.; Pérez-Álvarez, E. P. Study of Wine Volatile Composition of Tempranillo versus Tempranillo Blanco, a New White Grape Variety. *Beverages* **2021**, *7*, 72.
- (7) De Castilhos, M. B. M.; Del Bianchi, V. L.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín, I. Sensory Descriptive and Comprehensive GC–MS as Suitable Tools to Characterize the Effects of Alternative Winemaking Procedures on Wine Aroma. Part I: BRS Carmem and BRS Violeta. *Food Chem.* **2019**, *272*, 462–470.
- (8) Rubio-Bretón, P.; Salinas, M. R.; Nevares, I.; Pérez-Álvarez, E. P.; del Álamo-Sanza, M.; Marín-San Román, S.; Alonso, G. L.; Garde-Cerdán, T. Recent Advances in the Study of Grape and Wine Volatile Composition: Varietal, Fermentative, and Aging Aroma Compounds. In *Food Aroma Evolution During Food Processing, Cooking, and Aging*; Bordiga, M., Nolle, L. M. L., Eds.; CRC Press, 2019; pp 439–463.
- (9) Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. Applications of Solid-Phase Microextraction in Food Analysis. *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 35–62.
- (10) Fernández-Navales, J.; Barrio, I.; Diago, M. P. Non-Invasive Monitoring of Berry Ripening Using on-the-Go Hyperspectral Imaging in the Vineyard. *Agronomy* **2021**, *11*, 2534.
- (11) Smyth, H. E.; Cozzolino, D.; Cynkar, W. U.; Damberg, R. G.; Sefton, M.; Gishen, M. Near Infrared Spectroscopy as a Rapid Tool to Measure Volatile Aroma Compounds in Riesling Wine: Possibilities and Limits. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1911–1916.



- (12) Gerdes, S. M.; Winterhalter, P.; Ebeler, S. E. Effect of Sunlight Exposure on Norisoprenoid Formation in White Riesling Grapes. In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*; Winterhalter, P., Rouseff, R. L., Eds.; American Chemical Society, 2001; Vol. 802, pp 262–272.
- (13) Fernández-Novales, J.; Garde-Cerdán, T.; Tardaguila, J.; Gutiérrez-Gamboa, G.; Pérez-Alvarez, E. P.; Diago, M. P. Assessment of Amino Acids and Total Soluble Solids in Intact Grape Berries Using Contactless Vis and NIR Spectroscopy during Ripening. *Talanta* **2019**, *199*, 244–253.
- (14) Cataldo, E.; Fucile, M.; Mattii, G. B. Effects of Kaolin and Shading Net on the Ecophysiology and Berry Composition of Sauvignon Blanc Grapevines. *Agriculture* **2022**, *12*, 491.
- (15) Previtali, P.; Dokoozlian, N. K.; Pan, B. S.; Wilkinson, K. L.; Ford, C. M. The Effect of Ripening Rates on the Composition of Cabernet Sauvignon and Riesling Wines: Further Insights into the Sugar/Flavor Nexus. *Food Chem.* **2022**, *373*, No. 131406.
- (16) Droulia, F.; Charalampopoulos, I. Future Climate Change Impacts on European Viticulture: A Review on Recent Scientific Advances. *Atmosphere* **2021**, *12*, 495.
- (17) López, R.; Portu, J.; González-Arenzana, L.; Garijo, P.; Gutiérrez, A. R.; Santamaría, P. Ethepon Foliar Application: Impact on the Phenolic and Technological Maturities of Grapes. *J. Food Sci.* **2021**, *86*, 803–812.
- (18) Sadras, V. O.; Moran, M. A. Elevated Temperature Decouples Anthocyanins and Sugars in Berries of Shiraz and Cabernet Franc. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2012**, *18*, 115–122.
- (19) Meléndez, E.; Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A.; Iñiguez, M.; Puras, P. Modelling Phenolic and Technological Maturities of Grapes by Means of the Multivariate Relation between Organoleptic and Physicochemical Properties. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *2013*, 53–61.
- (20) Benelli, A.; Cevoli, C.; Fabbri, A. In-Field Vis/NIR Hyperspectral Imaging to Measure Soluble Solids Content of Wine Grape Berries during Ripening. In *2020 IEEE Int. Work. Metrol. Agric. For. MetroAgriFor 2020 – Proc.*, 2020; pp 99–103.
- (21) Lorenzo, C.; Garde-Cerdán, T.; Pedroza, M. A.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. Determination of Fermentative Volatile Compounds in Aged Red Wines by near Infrared Spectroscopy. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1281–1286.
- (22) Sun, D. W. *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control*; Elsevier: San Diego, CA, USA, 2010.
- (23) Gutiérrez, S.; Tardaguila, J.; Fernández-Novales, J.; Diago, M. P. On-the-Go Hyperspectral Imaging for the in-Field Estimation of Grape Berry Soluble Solids and Anthocyanin Concentration. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2019**, *127*–133.
- (24) Amigo, J. M. Practical Issues of Hyperspectral Imaging Analysis of Solid Dosage Forms. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 93–109.
- (25) Diago, M. P.; Fernández-Novales, J.; Fernandes, A. M.; Melo-Pinto, P.; Tardaguila, J. Use of Visible and Short-Wave Near-Infrared Hyperspectral Imaging to Fingerprint Anthocyanins in Intact Grape Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 7658–7666.
- (26) Grahn, H. F.; Geladi, P. *Techniques and Applications of Hyperspectral Image Analysis*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2007.
- (27) Tahir, H. E.; Xiaobo, Z.; Jianbo, X.; Mahunu, G. K.; Jiyong, S.; Xu, J. L.; Sun, D. W. Recent Progress in Rapid Analyses of Vitamins, Phenolic, and Volatile Compounds in Foods Using Vibrational Spectroscopy Combined with Chemometrics: A Review. *Food Anal. Methods* **2019**, *12*, 2361–2382.
- (28) Benelli, A.; Cevoli, C.; Ragni, L.; Fabbri, A. In-Field and Non-Destructive Monitoring of Grapes Maturity by Hyperspectral Imaging. *Biosyst. Eng.* **2021**, *207*, 59–67.
- (29) Gomes, V. M.; Fernandes, A. M.; Faia, A.; Melo-Pinto, P. Comparison of Different Approaches for the Prediction of Sugar Content in New Vintages of Whole Port Wine Grape Berries Using Hyperspectral Imaging. *Comput. Electron. Agric.* **2017**, *140*, 244–254.
- (30) Piazzolla, F.; Amodio, M. L.; Colelli, G. Spectra Evolution over On-Vine Holding of Italia Table Grapes: Prediction of Maturity and Discrimination for Harvest Times Using a Vis-NIR Hyperspectral Device. *J. Agric. Eng.* **2017**, *48*, 109–116.
- (31) Martínez-Sandoval, J. R.; Nogales-Bueno, J.; Rodríguez-Pulido, F. J.; Hernández-Hierro, J. M.; Segovia-Quintero, M. A.; Martínez-Rosas, M. E.; Heredia, F. J. Screening of Anthocyanins in Single Red Grapes Using a Non-Destructive Method Based on the near Infrared Hyperspectral Technology and Chemometrics. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1643–1647.
- (32) Zhang, N.; Liu, X.; Jin, X.; Li, C.; Wu, X.; Yang, S.; Ning, J.; Yanne, P. Determination of Total Iron-Reactive Phenolics, Anthocyanins and Tannins in Wine Grapes of Skins and Seeds Based on near-Infrared Hyperspectral Imaging. *Food Chem.* **2017**, *237*, 811–817.
- (33) Caporaso, N.; Whitworth, M. B.; Fisk, I. D. Prediction of Coffee Aroma from Single Roasted Coffee Beans by Hyperspectral Imaging. *Food Chem.* **2022**, *371*, No. 131159.
- (34) Ren, Y.; Huang, X.; Aheto, J. H.; Wang, C.; Ernest, B.; Tian, X.; He, P.; Chang, X.; Wang, C. Application of Volatile and Spectral Profiling Together with Multimode Data Fusion Strategy for the Discrimination of Preserved Eggs. *Food Chem.* **2021**, *343*, No. 128515.
- (35) Aheto, J. H.; Huang, X.; Tian, X.; Lv, R.; Dai, C.; Bonah, E.; Chang, X. Evaluation of Lipid Oxidation and Volatile Compounds of Traditional Dry-Cured Pork Belly: The Hyperspectral Imaging and Multi-Gas-Sensory Approaches. *J. Food Process Eng.* **2020**, *43*, No. e13092.
- (36) Tian, X. Y.; Aheto, J. H.; Huang, X.; Zheng, K.; Dai, C.; Wang, C.; Bai, J. W. An Evaluation of Biochemical, Structural and Volatile Changes of Dry-Cured Pork Using a Combined Ion Mobility Spectrometry, Hyperspectral and Confocal Imaging Approach. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 5972–5983.
- (37) Marín-San Román, S.; Carot, J. M.; Sáenz de Urturi, I.; Rubio-Bretón, P.; Pérez-Alvarez, E. P.; Garde-Cerdán, T. Optimization of Thin Film-Microextraction (TF-SPME) Method in Order to Determine Musts Volatile Compounds. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1226*, No. 340254.
- (38) Sánchez-Gómez, R.; Zalacain, A.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. Vine-Shoot Waste Aqueous Extracts for Re-Use in Agriculture Obtained by Different Extraction Techniques: Phenolic, Volatile, and Mineral Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 10861–10872.
- (39) Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S.; Lister, S. J. Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 772–777.
- (40) Savitzky, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* **1964**, *36*, 1627–1639.
- (41) Massart, D. L.; Vandeginste, E. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L.; Bertsch, W. *Chemometrics: A Textbook*, 1988; Vol. 12.
- (42) Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*; 2017.
- (43) Shenk, J. S.; Westerhaus, M. O. *Routine Operation, Calibration Development and Network System Management Manual*; NIRSystems Inc.: Silver Spring, 1995, Vol. 3.
- (44) Martin, M. A.; Roberts, S. An Evaluation of Bootstrap Methods for Outlier Detection in Least Squares Regression. *J. Appl. Stat.* **2006**, *33*, 703–720.
- (45) González-Barreiro, C.; Rial-Otero, R.; Cancho-Grande, B.; Simal-Gándara, J. Wine Aroma Compounds in Grapes: A Critical Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *55*, 202–218.
- (46) Black, C. A.; Parker, M.; Siebert, T. E.; Capone, D. L.; Francis, I. L. Terpenoids and Their Role in Wine Flavour: Recent Advances. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 582–600.
- (47) Darriet, P.; Thibon, C.; Dubourdieu, D. Aroma and Aroma Precursors in Grape Berry. In *The Biochemistry of the Grape Berry*, 2012; pp 111–136.
- (48) Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. Origins of Grape and Wine Flavor. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65*, 1–24.



(49) Garde-Cerdán, T.; Portu, J.; López, R.; Santamaría, P. Effect of Foliar Applications of Proline, Phenylalanine, Urea, and Commercial Nitrogen Fertilizers on Stilbene Concentrations in Tempranillo Musts and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2015**, *66*, 542–547.

(50) Marín-San Román, S.; Garde-Cerdán, T.; Baroja, E.; Rubio-Bretón, P.; Pérez-Álvarez, E. P. Foliar Application of Phenylalanine plus Methyl Jasmonate as a Tool to Improve Grenache Grape Aromatic Composition. *Sci. Hortic.* **2020**, *272*, No. 109515.

(51) Alem, H.; Rigou, P.; Schneider, R.; Ojeda, H.; Torregrosa, L. Impact of Agronomic Practices on Grape Aroma Composition: A Review. *J. Sci. Food Agric.* **2019**, *99*, 975–985.

(52) D'Onofrio, C.; Matarese, F.; Cuzzola, A. Effect of Methyl Jasmonate on the Aroma of Sangiovese Grapes and Wines. *Food Chem.* **2018**, *2018*, 352–361.

(53) Gutiérrez-Gamboa, G.; Garde-Cerdán, T.; Rubio-Bretón, P.; Pérez-Álvarez, E. P. Seaweed Foliar Applications at Two Dosages to Tempranillo Blanco (*Vitis Vinifera* L.) Grapevines in Two Seasons: Effects on Grape and Wine Volatile Composition. *Food Res. Int.* **2020**, *130*, No. 108918.

(54) Agati, G.; Meyer, S.; Matteini, P.; Cerovic, Z. Assessment of Anthocyanins in Grape (*Vitis Vinifera* L.) Berries Using a Noninvasive Chlorophyll Fluorescence Method. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1053–1061.

(55) Williams, P.; Norris, K. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*; Am. Assoc. Cereal Chem., 2001; pp 145–169.

(56) Gehlken, J.; Pour Nikfardjam, M.; Zörb, C. Determination of Aroma Compounds in Grape Mash under Conditions of Tasting by On-Line near-Infrared Spectroscopy. *Eur. Food Res. Technol.* **2022**, *248*, 2325–2337.

(57) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology: Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*; Wiley, 2006.

(58) Álvarez-Cid, M. X.; García-Díaz, A.; Rodríguez-Araújo, J.; Asensio-Campazas, A.; Vilanova De la Torre, M. Goal-Driven Phenotyping through Spectral Imaging for Grape Aromatic Ripeness Assessment. In *Pattern recognition and image analysis. IbPRIA 2015*; Springer, 2015; Vol. 9117, pp 272–280.

(59) Williams, P. C.; Sobering, D. C. How Do We Do It: A Brief Summary of the Methods We Use in Developing Near Infrared Calibration. In *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*; 1996; pp 185–188.

(60) Gao, S.; Xu, J.-H. Hyperspectral Image Information Fusion-Based Detection of Soluble Solids Content in Red Globe Grapes. *Comput. Electron. Agric.* **2022**, *196*, No. 106822.

(61) Xu, M.; Sun, J.; Yao, K.; Wu, X.; Shen, J.; Cao, Y.; Zhou, X. Nondestructive Detection of Total Soluble Solids in Grapes Using VMD-RC and Hyperspectral Imaging. *J. Food Sci.* **2022**, *87*, 326–338.

(62) Rodríguez-Pulido, F. J.; Mora-Garrido, A. B.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Research Progress in Imaging Technology for Assessing Quality in Wine Grapes and Seeds. *Foods* **2022**, *11*, 254.

(63) Nogales-Bueno, J.; Hernández-Hierro, J. M.; Rodríguez-Pulido, F. J.; Heredia, F. J. 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 Chem.* **2014**, *152*, 586–591.

## Recommended by ACS

### Examining How the Fermentation Medium Influences Thiol Expression and Its Perceived Aroma in Commercial Brewing Yeast Strains

Richard W. Molitor, Thomas H. Shellhammer, *et al.*

JANUARY 24, 2023

JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

READ 

### Colloidal Properties of Casein Micelles at Threefold and Natural Concentrations upon Calcium or Chelator Addition: Implications for Binding of Water and Calcium

Marius Reiter, Ulrich Kulozik, *et al.*

NOVEMBER 10, 2022

ACS FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

READ 

### Cry41-Related Mutants against *Myzus persicae* Based on Its Interaction with Cathepsin B

**4.3.2. Artículo 4: Uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) para la predicción de la composición aromática y los TSS en bayas de Tempranillo Blanco**

*Título:* Application of near-infrared spectroscopy for the estimation of volatile compounds in Tempranillo Blanco grape berries during ripening

*Publicado en:* Journal of the Science of Food and Agriculture.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.12706>.

*Autores:* Marín-San Román, S., Fernández-Navales, J., Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Diago, M. P., y Garde-Cerdán, T.

*Resumen*

En este trabajo se evaluó el uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) (1.100 – 2.100 nm) para estimar la composición aromática y los TSS de bayas de uva de *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco, durante su maduración. El objetivo principal fue diseñar una herramienta que permitiera estimar de forma rápida la madurez aromática de las uvas de Tempranillo Blanco en cualquier momento de la maduración, y de esta forma tener más información a la hora de escoger la fecha de vendimia, realizar técnicas vitícolas, o clasificar la uva en función de su calidad aromática.

Para ello, se adquirieron en el laboratorio un total de 240 espectros de muestras de bayas intactas mediante NIRS, en los que se identificaron tres picos de absorción, el primero a 1.143 nm, asignado al segundo sobretono del enlace C-H (estructura aromática y CH<sub>3</sub>), los otros dos a 1.450 nm y a 1.900 nm, relacionados con el primer sobretono del estiramiento simétrico y asimétrico del enlace hidroxilo (O-H), y con la combinación de estiramiento y deformación de este grupo en el agua, respectivamente.

#### 4. RESULTADOS

---

A partir de estas mismas muestras, se identificaron y cuantificaron un total de 20 compuestos volátiles mediante el método TF-SPME-GC-MS optimizado anteriormente, y se cuantificaron los TSS mediante refractometría. El contenido de compuestos volátiles se situó en el rango de 0,0006 µg/L para la β-damascenona, a 7.964,66 µg/L para el (E)-2-hexen-1-ol y el contenido de los sólidos solubles totales fue desde 11,30 °Brix a 24,90 °Brix. Estos dos métodos se utilizaron como métodos de referencia para la construcción de los modelos de calibración. Tras la construcción de los mismos se pudo observar como todos los compuestos menos el citral, presentaban valores de  $RPD_{cv} > 1,5$ , lo que indicó que los modelos de calibración construidos mostraron un rendimiento predictivo apropiado, e incluso varios compuestos representaron un  $RPD_{cv} > 3$ , considerado un rendimiento predictivo excelente. Los resultados obtenidos mostraron que los modelos construidos permitieron cuantificar la concentración de la mayoría de compuestos volátiles, de las familias químicas de compuestos volátiles y de los TSS, a lo largo de la maduración de uvas de Tempranillo Blanco.

En conclusión, se ha desarrollado una nueva metodología, basada en espectroscopía NIR, que permite estimar el contenido de compuestos volátiles, así como el contenido de TSS, en bayas de Tempranillo Blanco, en cualquier momento de la maduración. Este hecho es de gran utilidad para el viticultor y el bodeguero, ya que dispondrían de una mayor información a la hora de elegir la fecha de vendimia, de tomar medidas de corrección en el campo, y de dividir las bayas a su llegada a la bodega en función de sus características aromáticas.



## Research Article

Received: 3 February 2023

Revised: 25 April 2023

Accepted article published: 17 May 2023

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.12706

# Application of near-infrared spectroscopy for the estimation of volatile compounds in Tempranillo Blanco grape berries during ripening

Sandra Marín-San Román,<sup>a</sup> Juan Fernández-Novales,<sup>b,c,\*</sup>  
Cristina Cebrián-Tarancón,<sup>d</sup> Rosario Sánchez-Gómez,<sup>d</sup>  
María Paz Diago<sup>b,c,\*</sup> and Teresa Garde-Cerdán<sup>a,\*</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** The knowledge of volatile compounds concentration in grape berries is very valuable information for the wine-maker, since these compounds are strongly involved in the final wine quality, and in consumer acceptance. In addition, it would allow to set the harvest date according to aromatic maturity, to classify grape berries according to their quality and to make wines with different characteristics, among other implications. However, so far, there are no tools that allow the volatile composition to be measured directly on intact berries, either in the vineyard or in the winery.

**RESULTS:** In this work, the use of near-infrared (NIR) spectroscopy to estimate the aromatic composition and total soluble solids (TSS) of Tempranillo Blanco grape berries during ripening was evaluated. For this purpose, the spectra in the NIR range (1100–2100 nm) of 240 intact berry samples were acquired in the laboratory. From these same samples, the concentration of volatile compounds was analyzed by thin film-solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry (TF-SPME-GC-MS), and the TSS were quantified by refractometry. These two methods were used as reference methods for model building. Calibration, cross-validation and prediction models were built from spectral data using partial least squares (PLS). Determination coefficients of cross-validation ( $R^2_{CV}$ ) above 0.5 were obtained for all volatile compounds, their families, and TSS.

**CONCLUSIONS:** These findings support that NIR spectroscopy can be successfully use to estimate the aromatic composition as well as the TSS of intact Tempranillo Blanco berries in a non-destructive, fast, and contactless form, allowing simultaneous determination of technological and aromatic maturities.

© 2023 The Authors. *Journal of The Science of Food and Agriculture* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry.

**Keywords:** aromatic composition; NIR spectroscopy; non-destructive; partial least squares; TF-SPME; total soluble solids (TSS)

## INTRODUCTION

Grape and wine quality and value are directly related to the aromatic compounds that come from the berries, also called varietal aroma.<sup>1–3</sup> Therefore, the study of these compounds is highly relevant, since it is related to the acceptance or rejection of the wine by the consumer.<sup>4</sup> The aromatic characterization of Spanish white varieties has been little studied,<sup>5</sup> particularly that of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco.<sup>6–8</sup> This variety is a natural mutation of *Vitis vinifera* L. Tempranillo, and has been grown since 2008 only in the Appellation d'Origine Contrôlée (A.O.C.) Rioja. Today, *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco is the second white variety (12%) grown in the A.O.C. Rioja in terms of surface area, after *Vitis vinifera* L. Macabeo (a. k. a. Viura) (70%).<sup>6,7,9</sup> The fact that it is an exclusive variety of the A.O.C. Rioja gives it a special value to the producing area and allows it to be differentiated from other regions.

\* Correspondence to: J Fernández-Novales or M Paz Diago, Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Madre de Dios 53, Logroño, 26007, Spain, E-mail: [juan.fernandezn@unirioja.es](mailto:juan.fernandezn@unirioja.es); [maria-paz.diago@unirioja.es](mailto:maria-paz.diago@unirioja.es) and T Garde-Cerdán, Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Ctra. de Burgos, Km. 6, 26007 Logroño, Spain. E-mail: [teresa.garde.cerdan@csic.es](mailto:teresa.garde.cerdan@csic.es)

a Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Logroño, Spain

b Grupo TELEVITIS, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de La Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja), Logroño, Spain

c Departamento de Agricultura y Alimentación, Universidad de La Rioja, Logroño, Spain

d Cátedra de Química Agrícola, E.T.S. de Ingeniería Agronómica y de Montes y Biotecnología, Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

© 2023 The Authors. *Journal of The Science of Food and Agriculture* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Chemical Industry.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.



The volatile compounds present in grape berries are found in very low concentrations (ng/L to mg/L),<sup>10</sup> therefore, it is necessary to conduct a previous sample preparation step before chromatographic analysis.<sup>3,11</sup>

Analytical techniques, such as gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), have numerous drawbacks, including time consumption, sample preparation, reagent and instrumentation costs, the need for trained personnel among others.<sup>3</sup> Moreover, they are destructive. All these reasons prevent the winemaker from measuring the volatile compounds in the grapes throughout the ripening period. However, a good understanding and knowledge of the concentration of these compounds in the berries would enable the winemaker to make decisions regarding viticultural practices, the date of harvest, or to classify and grade the fruit according to its aromatic quality, hence to separate in different fermentation tanks according to their characteristics and final price.<sup>12,13</sup> This has become even more important in recent years due to the imbalance between industrial maturity (whose main measurement parameter is the total soluble solids, TSS) and phenolic and aromatic maturities, caused by global warming and climate change.<sup>14</sup> As a result, berries reach the appropriate TSS content (<sup>o</sup>Brix), which is the most used parameter used by winemakers to schedule the harvest date, but the proper content of phenolic and aromatic compounds is not always achieved.<sup>15,16</sup> In order to solve these problems, fast and non-destructive methods have been developed to relate multivariate spectroscopic and chemical data to the concentration of specific chemical components associated with grape quality.<sup>17–19</sup>

One of these technologies is near-infrared (NIR) spectroscopy which is a very powerful tool for non-invasive measurement of quality parameters during the grape ripening.<sup>12,18,20–24</sup> NIR spectroscopy is based on the relationship between the physico-chemical property to be measured and the absorption of light at different wavelengths in the NIR region (750–2500 nm).<sup>18,23,25,26</sup> This technique is under constant evolution, in terms of instrumentation, as well as the mathematical algorithms used to extract and process the information provided by the spectral data (chemometric analysis).<sup>25,27</sup> Some of the main advantages of NIR spectroscopy include rapid data collection, non-destructive measurement of samples, low cost, and accurate measurement.<sup>21,23,27–32</sup> Some studies focused on NIR spectroscopy to measure different quality parameters in grape berries and wines have been published in the last decade. Among them, some works have focused on the estimation of general parameters (pH, tartaric acid, density, malic acid, gluconic acid, assimilable nitrogen, etc.),<sup>19,22,26,33,34</sup> TSS,<sup>12,21,30,35</sup> amino acids,<sup>12</sup> phenolic compounds,<sup>20,26,36–38</sup> or acids.<sup>35</sup>

Regarding the content of volatile compounds, there are some works that have studied the wine aromatic composition<sup>13,29,39–42</sup> using NIR spectroscopy, but only a very limited number of them have focused on grape berries.<sup>18,43–45</sup> Therefore, the aim of this work was to evaluate the efficacy of NIR technology to assess the evolution of the aromatic composition and TSS of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco grape berries along ripening, during two vintages.

## MATERIALS AND METHODS

### Vineyard characteristics and experimental design

The *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco clusters were collected during the 2019 and 2020 seasons in a vineyard owned by the Gobierno de La Rioja, located in Finca La Grajera (Logroño, La

Rioja, Spain). The clusters were hand-picked randomly. The exact location of the vineyard plot is: 42°26'26.23" north latitude 2°30'51.25" west longitude; 447 m above sea level. The grapevines were grafted onto 110 Richter rootstock and were trained to a vertically shoot positioned system. The vineyard was planted in 2002 in an east–west orientation, and with a spacing between rows and within the row of 3.00 m × 1.10 m, respectively. Samples were collected from veraison to postharvest in both seasons. In 2019 clusters were collected along five dates: 12 August 2019, 19 August 2019, 26 August 2019, 2 September 2019, and 9 September 2019. In 2020 clusters were collected along seven dates: 29 July 2020, 5 August 2020, 12 August 2020, 19 August 2020, 26 August 2020, 2 September 2020, and 9 September 2020. At each date, 25 plastic bags were filled with 2–3 clusters of Tempranillo Blanco in each one. The clusters were frozen at –20°C until sample preparation.

### Sample preparation

All frozen bunches belonging to the same collected date were manually destemmed in a tray. The berries were mixed manually until homogenization was achieved. Finally, 20 bags were labeled and prepared, and 64 berries from the tray were added to each bag. The same process was repeated for all dates, until 20 bags, with 64 berries, were obtained per date. At the end of the process, 100 samples were obtained (5 dates × 20 samples/date) for 2019, and 140 samples (7 dates × 20 samples/date) for 2020, giving a total of 240 samples between the two seasons.

### NIR spectroscopy measurements

Spectral data were acquired using a NIR spectrometer operating in the range of 1100–2100 nm (PSS 2120, Polytec GmbH, Waldbronn, Germany) under laboratory conditions (Fig. 1). This spectrometer has a 2 nm resolution, with 501 datapoints per spectrum.<sup>12</sup> The spectrometer includes a polychromator as reflection light source selector, and an indium gallium arsenide (InGaAs) diode array detector. This device presents a sensor head (based on an integrated 20 W tungsten halogen lamp) for light capturing, a processing unit and an optical fiber linking them. Each spectrum was recorded under laboratory conditions at room temperature (23 °C) in reflectance mode by an average of 32 scans, without any sample preparation (directly on intact grape berries). The height between the sensor head and the sample to be acquired was 250 mm. The sensor head is provided with an embedded white and dark reference mechanism triggered by the software. As advised by the spectrometer's manufacturer, white and dark reference measurements were performed at the



Figure 1. NIR spectrometer covering the range 1100–2100 nm.



beginning of the day and every 200 spectra approximately. The white reference material is referred to as a Spectralon™-like material by the manufacturer. Spectra were corrected using the white and dark reference values according to Eqn (1).

$$R(\lambda) = \frac{G(\lambda) - D(\lambda)}{W(\lambda) - D(\lambda)} \quad (1)$$

where  $\lambda$  is a wavelength (in nanometers),  $G$  is the intensity of the light reflected by the berries (in nanometers),  $W$  is the intensity of the light coming from the white reference (in nanometers), and  $D$  is the dark reference (in nanometers). Afterwards, the reflectance ( $R$ ) was converted into absorbance [ $\log(1/R)$ ] (in nanometers).

For the spectral contactless measurement of the 240 samples, eight subsamples consisting of eight berries each were measured and averaged. In this way, the 64 berries that formed each sample were measured (eight subsamples  $\times$  eight berries). These berries were placed on a plate (fruit holder) within the measurement area, with the pedicel of berries downwards to avoid differences between the berry surface and the pedicel (Fig. 2(a)). Between samples, the plate was cleaned to remove previous residues. Berry samples were naturally thawed at ambient temperature, and they were carefully dried with kimwipe paper before their measurement with NIR.

#### Analysis of TSS and volatile compounds

##### Materials and reagents

Chromatographic standards  $\alpha$ -terpineol, geraniol, linalool,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, benzaldehyde, 2-phenylethanol, benzyl alcohol, octanoic acid, decanoic acid, 2-hexenal, hexanal, 1-hexanol, 2-hexen-1-ol, 2-octanol (internal standard, IS), and the reagent sodium chloride (NaCl) and ethanol (EtOH), were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified through a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Thin film (TF) with polydimethylsiloxane and carboxen (PDMS/CAR) (carbon fabric film thickness 450  $\mu$ m), liners packed with Tenax TA™, and borosilicate magnetic stirrers were obtained from GERSTEL GmbH & Co (Mülheim an der Ruhr, Germany). BP21 capillary column [30 m length, 0.25 mm inner diameter (i.d.), and 0.25  $\mu$ m film thickness] was purchased from SGE (Ringwood, Australia).

Blender was bought from Philips (Amsterdam, the Netherlands). The refractometer, oven, and six-position stirrer plates were purchased from Actylab (Logroño, La Rioja, Spain). Gas chromatograph (Agilent 7890A) and mass spectrometer (Agilent 5975C) were purchased from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). The autosampler system consisted of a multi-purpose sampler (MPS) equipped with 98 tube tray, thermal desorption unit (TDU), and cooled injection system (CIS-4) connected to a cryo-static cooling device (CCD2). MPS, automated TDU, and CCD2 were provided from GERSTEL.

##### TSS measurement by refractometry

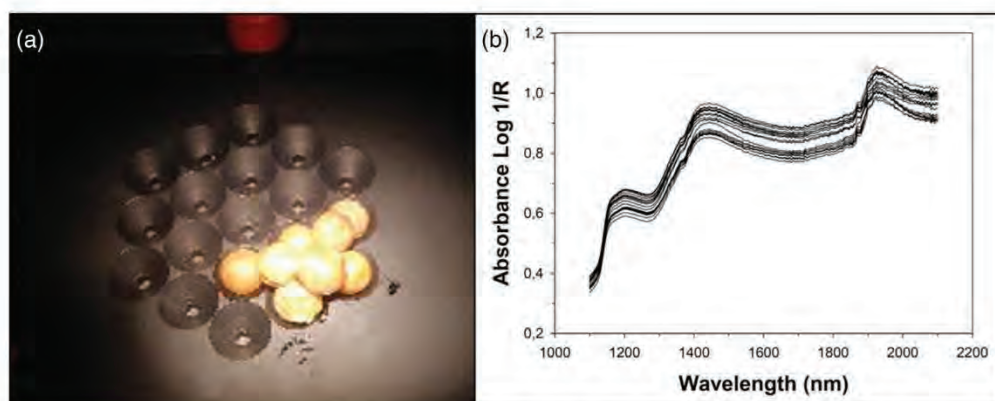
The same 64 berries from which the NIR spectra was acquired, were triturated for 30 s in the blender. The paste obtained was introduced into a 50 mL Falcon, and centrifuged at 3900 rpm, for 15 min. For each sample, TSS were measured with a refractometer, adding a few drops of the centrifuged must, and expressed as °Brix.

##### Extraction of volatile compounds by TF-SPME

For the volatile compound analysis, the extraction method of Marín-San Román *et al.*<sup>46</sup> was optimized. A 9 mL aliquot of centrifuged must sample were added in a 10 mL screw capped vial. In addition, 25  $\mu$ L of the 2-octanol solution (5  $\mu$ L 2-octanol/100 mL ethanol), and 2.5 g of NaCl, were added to the same vial. TF (PDMS/CAR) was suspended in the screw capped vial. All samples were stirred at 500 rpm, with a borosilicate magnetic stirrer, for 6 h at room temperature. After this time, the TF was removed with tweezers, dried with a tissue paper, and placed in a TDU tube with glass wool at the base. The TDU tube was sealed with a transport adapter and placed in a 98 position Twister rack on the MPS robotic for automated analysis. The analysis of volatiles was carried out on a GC-MS, equipped with an automated TDU.

##### Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) conditions

The chromatographic method described in Sánchez-Gómez *et al.*<sup>47</sup> was used with some modifications adapted to the thin film-solid-phase microextraction (TF-SPME). TF-SPME devices were thermally desorbed at a constant pressure of 20.75 psi in the TDU, in splitless desorption mode, increasing the temperature from 40 °C to 250 °C at a rate of 60 °C/min and holding at the final temperature for 5 min. The analytes were focused in a



**Figure 2.** (a) Detail of the sensor during spectral acquisition on eight grape berries with the NIR spectrometer, (b) average absorbance spectra of the 20 grape berry samples, forming date 1 (29 July 2020) of the 2020 vintage, in the NIR range.



programmed temperature vaporizing injector (CIS-4), containing a Tenax TA™ – packed liner with 20 mg of Tenax, held at  $-40^{\circ}\text{C}$  with the CCD2 prior to injection. After desorption and focusing, the CIS-4 temperature was programmed from  $-40^{\circ}\text{C}$  to  $230^{\circ}\text{C}$  at  $12^{\circ}\text{C/s}$  and held at  $230^{\circ}\text{C}$  for 5 min to transfer volatiles onto the analytical column. The CIS-4 operated in solvent vent mode (purge flow to split vent of 80 mL/min at 2 min, vent 60 mL/min and pressure 20.85 psi). The desorbed volatile compounds were separated in the gas chromatograph system coupled to a quadrupole electron ionization mass spectrometric detector, equipped with a fused silica capillary column (BP21 stationary phase, 30 m length, 0.25 mm i.d. and 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness). The helium carrier gas had a constant column pressure of 20.75 psi. The oven temperature of GC was programmed at  $40^{\circ}\text{C}$  (2 min), raised to  $80^{\circ}\text{C}$  ( $5^{\circ}\text{C/min}$ , held for 2 min) then to  $130^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C/min}$ , held 5 min) then to  $150^{\circ}\text{C}$  ( $5^{\circ}\text{C/min}$ , held for 5 min) and finally to  $230^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C/min}$ , held 5 min). Transfer line temperature was  $235^{\circ}\text{C}$ . The MS operated in scan mode (35–180 amu) with ionization energy set at 70 eV. In order to identify each compound within the chromatogram, the mass spectra obtained were compared with those provided in the NIST library and with the retention time obtained for each standard. Compounds for which no standard was available were identified using the NIST library. All compounds were integrated in extraction ion chromatogram (EIC) mode by isolating the target ion of each compound individually. In this way, matrix interferences were eliminated. The target ions were  $m/z$  41 for 2-hexenal,  $m/z$  43 for acetic acid,  $m/z$  45 for 2-octanol (IS),  $m/z$  56 for hexanal, and 1-hexanol,  $m/z$  57 for (*E*)-2-hexen-1-ol, and 2-ethyl-1-hexanol,  $m/z$  59 for  $\alpha$ -terpineol,  $m/z$  60 for hexanoic acid, octanoic acid, nonanoic acid, and decanoic acid,  $m/z$  67 for 3-hexen-1-ol,  $m/z$  69 for citral,  $\beta$ -damascenone, and geraniol,  $m/z$  71 for linalool,  $m/z$  77 for benzaldehyde,  $m/z$  79 for benzyl alcohol,  $m/z$  91 for 2-phenylethanol,  $m/z$  119 for *p*-cymene, and  $m/z$  177 for  $\beta$ -ionone. Quantification was based on the calibration curves of the respective standards.

#### Calibration curves

The solutions of the calibration curves were analyzed by the method optimized by Marín-San Román *et al.*<sup>46</sup> TF-SPME under 500 rpm stirring, for 6 h, at  $20^{\circ}\text{C}$ . Standard solutions were prepared in 50 mL of ethanol. Each one had different concentrations of each of the compounds. After extraction, they were desorbed and analyzed in GC-MS, performing three replicates of each. The compounds used, and the determination coefficients ( $R^2$ ) of the calibration curves were the following:  $\alpha$ -terpineol (0.9942), geraniol (0.9154), linalool (0.9643),  $\beta$ -damascenone (0.9684),  $\beta$ -ionone (0.9803), benzaldehyde (0.9684), 2-phenylethanol (0.9853), benzyl alcohol (0.9961), octanoic acid (0.9707), decanoic acid (0.9846), 2-hexenal (0.9937), hexanal (0.9898), 1-hexanol (0.9706), and 2-hexen-1-ol (0.9748). The curve of each compound is formed by a minimum of four points and a maximum of seven points of different concentrations. The concentration of some volatile compounds, for which no calibration curve was available, was then calculated using the calibration curve of another compound belonging to the same family, and whose concentration was in a similar range. Likewise, for citral, the linalool curve was used; for *p*-cymene, the  $\alpha$ -terpineol curve was employed; for acetic, hexanoic, and nonanoic acids, the decanoic acid curve was utilized; and for 3-hexen-1-ol, the 2-hexen-1-ol curve was used.

#### Spectral data analysis

The spectral data collected with the Polytec PSS 2120 sensor were analyzed through the SL Utilities software (version 3.1; Polytec GmbH, Waldbronn, Germany). A visual analysis to examine the behavior of each subsample and detect possible anomalous spectra was carried out. The average spectrum of each sample was represented by averaging the eight spectra acquired of the eight subsamples, that is of the 64 berries.

The WinISI II software package version 1.50 (Infrasoft International, PortMatilda, PA, USA) was used for spectral data processing and statistical analysis of NIR spectra. For each analytical parameter, different mathematical treatments were evaluated for scatter correction, including the standard normal variate (SNV) and Detrending (DT) methods. Furthermore, two derivative mathematical treatments were tested in the development of NIR spectral calibrations models, in the spectral region 1600–2400 nm, where the first digit is the number of the derivative (*a*), the second is the gap over which the derivative is calculated (*b*), the third is the number of data points in a running average or smoothing (*c*), and the fourth is the second smoothing (*d*).<sup>48</sup> The averaged spectrum for each sample (Fig. 2(b)) was processed as input for a principal component analysis (PCA) in order to explore the data structure, to visualize the presence of spectra outliers and also to identify the main sources of variability in the spectra.<sup>49,50</sup> Modified partial least squares (MPLS) regression was used for the prediction of the individual and families of the volatile compounds and TSS using the spectra acquired on intact grape berries in the NIR range (1100–2100 nm). MPLS finds the combinations of predictor values that have the greatest covariance with the response.<sup>51</sup> To prevent over-fitting, the appraisal of the calibration model was performed by a four-fold cross-validation. In this method, the set of calibration samples was divided into four groups, using one of them to check the results (prediction) and the remaining (four groups) to build the calibration model. This was repeated as many times as groups were (four in total), in such a way that all the samples were used in both the calibration and prediction sets. In this process another type of outlier (chemical outliers) was analyzed using Student's *t* statistic, which indicates the difference between the reference and the predicted value. The Studentized residuals from the regression models fitted using least-squares is a very common approach to identifying discordant observations in linear regression problems.<sup>52</sup> A critical limit of  $t > 2.5$  was used to identify samples as chemical outliers.<sup>48</sup> In order to train robust models, capable of predicting totally unknown samples, the original dataset, with 240 samples was split into two independent datasets: a calibration one, consisting of 192 samples (80%) assigned randomly, and a prediction set (20%), which comprised the remaining 48 samples (Table 1). Each set included samples that were appropriately distributed and covered the entire range of the volatile compounds and TSS. Although the same number of samples were used for the data set (240), for the calibration set (192), and for the external prediction set (48), not all the compounds could be found in all of them, so the *N* value may change in each of them (Table 1). The accuracy of the calibration depends on the model errors, patently, standard error of cross-validation (SECV) and standard error of prediction (SEP) used for internal validation or external prediction, respectively. The number of latent variables (LVs) and determination coefficients of calibration, cross-validation or external prediction ( $R^2_c$ ,  $R^2_{cv}$  and  $R^2_p$ , respectively) to represent the proportion of explained variance of the response variables were also computed. The optimal number of LVs was selected as the one yielding the lowest SECV. Additionally, the



**Table 1.** Descriptive statistics of 20 volatile compounds content ( $\mu\text{g/L}$ ), the total of each family content ( $\mu\text{g/L}$ ), and total soluble solids ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) of Tempranillo Blanco grape berries

Compounds	Data set				Calibration set				External prediction set						
	N	Minimum	Maximum	Mean	SD	N	Minimum	Maximum	Mean	SD	N	Minimum	Maximum	Mean	SD
<b>Terpenoids</b>															
$\alpha$ -Terpineol	236	0.022	5.41	0.69	1.14	189	0.022	5.41	0.68	1.15	47	0.024	3.24	0.77	1.11
Citral	233	1.24	301.19	34.11	52.43	186	1.24	301.19	34.05	53.91	47	3.25	180.09	34.33	46.64
Geraniol	172	0.12	76.85	2.38	6.89	132	0.12	76.85	2.64	7.77	40	0.27	9.58	1.54	2.10
Linalool	227	0.33	29.08	3.12	4.50	182	0.33	29.08	3.00	4.54	45	0.47	18.65	3.58	4.34
<i>p</i> -Cymene	238	0.032	17.92	0.97	2.32	191	0.032	17.92	0.98	2.45	47	0.038	7.36	0.92	1.69
Total terpenoids	238	0.69	333.74	39.74	58.23	191	0.69	333.74	39.49	59.78	47	4.46	204.47	40.75	52.06
<b><i>C</i><sub>13</sub> norisoprenoids</b>															
$\beta$ -Damascenone	234	0.00065	9.63	0.58	1.29	187	0.0006	9.63	0.53	1.25	47	0.00093	6.63	0.79	1.42
$\beta$ -Ionone	238	0.0013	0.59	0.043	0.081	191	0.0013	0.59	0.04	0.08	47	0.0017	0.35	0.047	0.074
Total <i>C</i> <sub>13</sub>	238	0.0026	10.22	0.61	1.35	191	0.0026	10.22	0.56	1.31	47	0.0030	6.98	0.83	1.49
<b>norisoprenoids</b>															
<b>Benzenoids</b>															
Benzaldehyde	235	0.14	10.29	1.67	1.86	188	0.14	10.29	1.66	1.88	47	0.21	6.79	1.73	1.78
2-Phenylethanol	238	7.07	330.70	60.20	73.53	191	7.07	330.70	60.00	75.05	47	12.50	318.89	61.02	67.76
Benzyl alcohol	237	1.30	90.35	11.64	14.52	190	1.30	90.35	11.36	14.40	47	2.50	77.52	12.77	15.08
Total benzenoids	238	9.09	401.78	73.44	88.91	191	9.09	393.11	72.93	90.30	47	15.50	401.78	75.52	83.97
<b>Fatty acids</b>															
Acetic acid	238	1.05	221.49	19.17	21.82	191	1.05	221.49	19.75	23.39	47	2.17	76.41	16.83	13.65
Hexanoic acid	238	0.59	153.97	10.15	19.69	191	0.59	153.97	10.46	20.17	47	0.77	96.68	8.88	17.76
Octanoic acid	238	0.18	17.59	1.85	2.44	191	0.18	17.59	1.90	2.60	47	0.19	6.95	1.66	1.68
Nonanoic acid	238	0.053	5.82	0.47	0.61	191	0.053	5.82	0.47	0.64	47	0.076	2.08	0.46	0.47
Decanoic acid	176	0.025	3.56	0.15	0.33	144	0.025	3.56	0.16	0.36	32	0.029	0.58	0.12	0.13
Total fatty acids	238	1.91	308.92	31.64	38.40	191	1.91	308.92	32.58	40.13	47	4.77	164.49	27.83	30.45
<b>C6 compounds</b>															
2-Hexenal	238	19.11	2137.39	270.69	364.00	191	19.11	2137.39	271.22	371.33	47	26.73	1369.71	268.56	336.30
Hexanal	238	10.17	3693.21	378.80	586.28	191	10.17	3693.21	379.87	608.50	47	14.56	2930.11	374.46	491.46
1-Hexanol	238	18.25	882.20	141.93	108.78	191	18.25	882.20	138.54	107.42	47	28.26	640.62	155.69	114.28
2-Hexen-1-ol	184	23.95	7964.66	1026.07	1207.08	147	23.95	7964.66	973.43	1192.02	37	27.07	5029.11	1235.18	1260.07
3-Hexen-1-ol	237	38.77	7680.73	903.07	1092.15	191	38.77	7680.73	875.39	1054.58	46	78.96	6455.88	1018.01	1242.24
Total C6 compounds	238	344.05	14 881.10	2483.96	2381.48	191	344.05	14 881.10	2414.20	2341.02	47	543.15	11 236.81	2767.43	2545.92
Total positive compounds	238	17.53	784.05	145.44	154.04	191	17.53	784.05	145.57	158.05	47	30.25	557.91	144.93	138.13
TSS	240	11.30	24.90	19.46	3.34	192	11.30	24.90	19.31	3.39	48	12.20	24.50	20.05	3.11

Note: N, number of samples; SD, standard deviation; TSS, total soluble solids; Total positive compounds, the sum of all families except C6 compounds.



residual predictive deviation ( $RPD_{CV}$ ), calculated as the ratio between the standard deviation of the reference data for the training set and the SECV, together with the bias and slope, was also computed (Table 2).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Content of grape volatile compounds and TSS

Table 1 shows the number of samples ( $M$ ), mean, maximum and minimum value, and standard deviation of the 20 volatile compounds identified, their total content by chemical families, and TSS. The number of samples is different for each compound. This is due to the fact that, although the number of samples analyzed was 240, not all the compounds appeared in all chromatograms.

The volatile compounds were classified into six groups: terpenoids,  $C_{13}$  norisoprenoids, benzenoids, fatty acids, C6 compounds and total positive compounds (the total of all groups except C6 compounds).

Volatile compounds and TSS were measured from veraison to postharvest, covering a wide range of concentrations and °Brix, as shown in Table 1. Volatile compounds concentration ranged from 0.0006  $\mu\text{g/L}$  for  $\beta$ -damascenone to 7964.66  $\mu\text{g/L}$  for 2-hexen-1-ol.

Terpenoids are the most studied varietal compounds in grapes and, in general, they are alcohols and oxides of ten carbon atoms.<sup>53,54</sup> They are synthesized during grape ripening, and are located mainly in the grape skin,<sup>53</sup> and are responsible for fruity and floral aromas.<sup>55,56</sup> They are found in berries in free and glycosylated form, being the glycosylated fraction the most abundant. In this work, five terpenoids were found (Table 1);  $\alpha$ -terpineol, citral, geraniol, linalool, and  $p$ -cymene.  $\alpha$ -Terpineol, geraniol, and linalool are some of the most odoriferous ones.<sup>55</sup> The most abundant terpenoid in Tempranillo Blanco was citral, followed by linalool (Table 1).

The  $C_{13}$  norisoprenoids are compounds derived from the enzymatic degradation of carotenoids.<sup>57,58</sup> Since  $C_{13}$  norisoprenoids are terpenes, they can also be found in grapes in free or bound form (glycoside glycosides). The  $C_{13}$  norisoprenoids are present in grape berries in very low concentrations, but they have a very low perception threshold (700 ng/L for  $\beta$ -ionone and 200 ng/L for  $\beta$ -damascenone), and therefore contribute significantly to the aromatic potential.<sup>55</sup> A positive correlation has been observed between  $C_{13}$  norisoprenoids and fruity aromas, especially in  $\beta$ -damascenone (apple juice and tropical fruit).<sup>54</sup>  $\beta$ -Ionone is related to violet aroma.<sup>54</sup> In *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco,  $\beta$ -damascenone was the most abundant  $C_{13}$  norisoprenoid (Table 1). This result coincides with the only two works found in the literature that have studied the volatile composition of *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries.<sup>9,59</sup>

Terpenoids and  $C_{13}$  norisoprenoids are two of the families that most contribute to the grape varietal aroma.<sup>53,55</sup>

Benzenoids are a diverse group of volatile compounds that can contribute significantly to the wine aroma.<sup>60</sup> They are synthesized late in the development of the grape, are present in very low quantities in grapes, and are mostly found as glycosylated precursors.<sup>55,59</sup> It can be observed that 2-phenylethanol, with a rose aroma descriptor,<sup>61</sup> was the most abundant benzenoid in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco musts, followed by benzyl alcohol, and finally benzaldehyde. These results are consistent with those obtained by García *et al.*<sup>62</sup> for grapes of the white varieties Airén, Macabeo (Viura), and Chardonnay. However, this result is not consistent with the results obtained

in Gutiérrez-Gamboa *et al.*<sup>59</sup> and in Garde-Cerdán *et al.*<sup>9</sup> in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco grapes, where 2-phenylethanol was the least abundant benzenoid.

Fatty acids can be short chain (< 6 carbons), medium chain (6–12 carbons) and long chain (> 12 carbons).<sup>60</sup> In this work, five fatty acids were found, one of short chain (acetic acid), which was the most abundant, and is formed as a metabolic intermediate in the synthesis of acetyl-CoA,<sup>60</sup> and four corresponding to the medium chain group (hexanoic acid, octanoic acid, nonanoic acid, and decanoic acid).

The C6 compounds, also known as 'green leaf volatiles', are present in all grapes in free form.<sup>53</sup> These compounds are formed from fatty acids by the lipoxygenase pathway, and are responsible for the green aroma in the must.<sup>60</sup> The most abundant family of volatile compounds found in the *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries was the C6 compound-family (Table 1). This result is consistent with the majority of studies on volatile compounds in red,<sup>63–65</sup> and white grape berries,<sup>5,62</sup> and specifically, also in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries.<sup>9,59</sup> The most abundant C6 compound was 2-hexen-1-ol (Table 1). Despite being very abundant compounds in grapes, they have a very high perception threshold, so they are among the least odorous compounds<sup>53,54</sup> having a more limited impact in final olfactory perception of the resulting wines.

With respect to the TSS, the range was from 11.30 °Brix, obtained in less ripe grapes, to 24.90 °Brix, corresponding to ripe grapes.

It can be observed that the standard deviation of the compounds was very high, this is due to the difference between the ripening stages of the grapes. Owing to carrying out such a wide and representative sampling allowed us to build robust models.

### Analysis of NIR spectra

Figure 2(b) shows the average absorbance spectra of the 20 samples from the first sampling date of 2020, in the range 1100 to 2100 nm. Three absorption peaks can be identified. The first one, over 1143 nm, is assigned to the second C–H stretch overtone (aromatic structure and  $\text{CH}_3$ ). The other two peaks, over 1450 nm and 1900 nm are respectively related to the first overtone of the symmetric and asymmetric hydroxyl (O–H) bond stretching and the combination of stretch and deformation of this group in water, which is the predominant constituent of grape berries.<sup>12,23</sup>

### Calibration, cross-validation, and external prediction results for the NIR models of volatile compounds content and TSS

Table 2 shows the mathematical pre-treatments that provided the best results in calibration, cross-validation, and external prediction for each volatile compound, their families, and the TSS. As in Table 1, the standard deviation of the volatile compounds was higher than the mean, because the berries were harvested at different ripening times in order to obtain a wide range of both volatile compounds and TSS.

Different mathematical treatments were tested in the development of NIR spectral calibrations set ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ), as previously discussed. In Table 2,  $N$  corresponds to the number of samples in the calibration set, excluding the chemical anomalies (eliminating the samples that had  $t > 2.5$ ). Table 2 also shows the values of  $R^2_C$ ,  $R^2_{CV}$ , and  $R^2_P$ , which correspond to the coefficient of determination of the calibration, cross-validation, and prediction, respectively. Volatile compounds, families and TSS with  $R^2_{CV}$  values



**Table 2.** Calibration, cross-validation, and external prediction results for the near-infrared (NIR) models of volatile compounds content ( $\mu\text{g/L}$ ), the total of each family content ( $\mu\text{g/L}$ ), and total soluble solids ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) in Tempranillo Blanco grape berries

Compounds	Spectral treatment	N	Mean	SD	LV	Calibration			Cross-validation			External prediction		
						SEC	$R^2_C$	SEP	SECV	$R^2_{CV}$	RPD <sub>CV</sub>	$R^2_P$	Bias	Slope
<b>Terpenoids</b>														
$\alpha$ -Terpineol	2.5.5.1	153	0.35	0.74	7	0.12	0.97	0.18	0.94	4.11	0.50	0.80	0.11	1.05
Citral	2.5.5.1	143	14.54	7.99	4	4.05	0.74	5.42	0.56	1.47	52.11	0.02	21.22	-0.96
Linalool	1.5.5.1	151	1.69	2.00	10	0.43	0.95	0.69	0.88	2.90	4.10	0.20	1.24	0.73
p-Cymene	Snv-DT 1.5.5.1	144	0.19	0.32	4	0.094	0.91	0.13	0.89	2.46	1.62	0.26	0.62	1.87
Total terpenoids	Snv-DT 1.5.5.1	163	20.44	17.82	9	7.04	0.84	10.63	0.64	1.68	29.01	0.77	10.56	1.31
<b>C<sub>13</sub> norisoprenoids</b>														
$\beta$ -Damascenone	Snv-DT 1.5.5.1	157	0.19	0.56	10	0.11	0.96	0.17	0.90	3.29	0.92	0.70	0.30	1.52
$\beta$ -Ionone	1.5.5.1	147	0.014	0.027	7	0.0061	0.95	0.0079	0.92	3.42	0.06	0.54	0.02	1.59
Total C <sub>13</sub> norisoprenoids	2.5.5.1	145	0.050	0.20	8	0.039	0.96	0.074	0.92	2.70	1.53	0.18	0.66	1.91
<b>Benzenoids</b>														
Benzaldehyde	2.5.5.1	145	0.95	0.85	6	0.21	0.94	0.31	0.88	2.74	1.62	0.31	0.66	1.18
2-Phenylethanol	2.5.5.1	147	28.42	24.75	6	7.30	0.91	9.68	0.85	2.56	61.97	0.29	24.12	1.26
Benzyl alcohol	1.5.5.1	166	7.97	9.36	7	2.33	0.94	2.87	0.91	3.26	11.80	0.43	3.25	1.13
Total benzenoids	1.5.5.1	152	36.95	35.40	7	9.97	0.92	13.00	0.89	2.72	72.11	0.29	23.27	-0.62
<b>Fatty acids</b>														
Hexanoic acid	Snv-DT 1.5.5.1	140	3.64	3.29	5	1.38	0.82	1.85	0.70	1.78	18.28	0.006	5.02	0.47
Octanoic acid	1.5.5.1	152	1.03	0.84	8	0.25	0.91	0.34	0.83	2.47	1.60	0.17	0.41	0.71
Nonanoic acid	2.5.5.1	142	0.28	0.19	6	0.046	0.94	0.071	0.86	2.68	0.46	0.09	0.10	0.58
Decanoic acid	Snv-DT 2.5.5.1	128	0.082	0.039	2	0.021	0.70	0.023	0.65	1.70	0.12	0.12	0.03	1.16
Total fatty acids	1.5.5.1	159	21.38	17.99	7	8.54	0.77	10.74	0.64	1.68	27.76	0.19	3.45	0.73
<b>C6 compounds</b>														
2-Hexenal	1.5.5.1	145	131.30	80.33	4	22.89	0.92	28.77	0.87	2.79	364.85	0.006	145.27	0.37
Hexanal	1.5.5.1	156	230.19	167.62	8	28.48	0.97	36.75	0.95	4.56	429.60	0.30	111.34	1.45
1-Hexanol	Snv-DT 1.5.5.1	173	120.73	77.04	7	27.65	0.87	34.29	0.80	2.25	101.35	0.28	31.10	0.86
2-Hexen-1-ol	1.5.5.1	132	733.26	752.03	6	268.70	0.87	329.40	0.81	2.28	872.51	0.56	280.81	1.04
3-Hexen-1-ol	2.5.5.1	177	720.56	722.33	5	235.20	0.89	282.86	0.85	2.55	796.98	0.62	153.26	1.26
Total C6 compounds	Snv-DT 1.5.5.1	170	1914.64	1585.10	7	423.12	0.93	533.05	0.89	2.97	1805.04	0.53	509.87	1.08
Total positive compounds	Snv-DT 1.5.5.1	168	119.02	130.59	8	32.50	0.94	41.93	0.90	3.11	101.35	0.57	-9.77	0.69
TSS	Snv-DT 1.5.5.1	179	19.35	3.44	11	0.55	0.97	0.79	0.95	4.35	0.99	0.90	0.10	1.02

Note: Spectral treatment: four-figure code (a.b.c.d), where 'a' refers to the number of the derivative, 'b' is the gap over which the derivative is calculated, 'c' corresponds to the number of data points in a running average or smoothing, and 'd' refers to the second smoothing; Snv-DT, standard normal variate plus detrending; N, number of samples were the ones used for calibration and cross-validation models after chemical outlier detection ( $t > 2.5$ ); SD, standard deviation; SEC, standard error of calibration;  $R^2_C$ , determination coefficient of calibration; SECV, standard error of cross-validation;  $R^2_{CV}$ , determination coefficient of cross-validation; RPD<sub>CV</sub>, residual predictive deviation of cross-validation; SEP, standard error of prediction;  $R^2_P$ , determination coefficient of prediction; TSS, total soluble solids; Total positive compounds, the sum of all families except C6 compounds.



between 0.3 and 0.5 are considered to provide good separation between high and low values. The  $R^2_{CV}$  values between 0.5 and 0.7 provide good separation between high, medium and low values. The  $R^2_{CV}$  values between 0.7 and 0.9 are considered a good adjustment, and, finally,  $R^2_{CV}$  values  $\geq 0.9$  provide an excellent adjustment.<sup>48</sup> Table 2 shows that all the volatile compounds and their families had a  $R^2_{CV} > 0.5$ , so it can be affirmed that the models obtained for all the compounds and families can differentiate between high, medium, and low concentration values. In turn, all compounds and families except citral, total terpenoids, decanoic acid, and total fatty acids presented a  $R^2_{CV} \geq 0.7$ , which indicated that the concentration of these compounds can be quantified with the obtained models. This would have numerous benefits in the wine industry, allowing to classify grape berries according to their aromatic quality, as well as to choose the collected date accurately. The  $R^2$  of a set of samples depends mainly on how those samples are distributed within the set. For this reason, the main difference between  $R^2_{CV}$  and  $R^2_P$  is the variability of the data from the calibration set, and from the prediction set, respectively. As the samples from the prediction set were randomly selected, and there were far fewer than those from the calibration set, they were not uniformly distributed over the entire range of concentrations, which is why  $R^2_P$  decreases, and there is such a difference with  $R^2_{CV}$ .

Table 2 also shows the number of LVs, a low number of LV favors the robustness and the generalization capability of the developed models, minimizing potential overfitting events, which ranged from 2 to 11, and the RPD<sub>CV</sub>, which presented values from 1.47 to 4.56. RPD indicates the precision behavior of the prediction in comparison with the average of all the samples. Models with a RPD < 1.5 are not considered adequate, while those showing RPD values ranging from 1.5 to 2.0 are suitable for differentiating the variability of the data. However, RPD > 2 shows very good predictive performance, and RPD > 3 can be considered excellent.<sup>51</sup> It can be seen in Table 2 that all the models except for citral have a RPD > 1.5. In addition, the models obtained for the linalool, *p*-cymene, total C<sub>13</sub> norisoprenoids, benzaldehyde, 2-phenylethanol, total benzenoids, octanoic acid, nonanoic acid, 2-hexenal, 1-hexanol, 2-hexen-1-ol, 3-hexen-1-ol, and total C<sub>6</sub> compounds, have a RPD<sub>CV</sub> > 2, thus showing very good predictive performance. Finally, the models obtained for the  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -damascenone,  $\beta$ -ionone, benzyl alcohol, hexanal, total positive compounds and TSS, show a RPD<sub>CV</sub> > 3, so the predictive performance of these models can be considered excellent. Considering that volatile compounds are found in very low concentrations in grape berries, finding models that can predict their concentration throughout ripening by taking non-destructive spectral measurements, on intact berries, is a result of great value and with great applications in the future. For instance, to define the harvesting date accordingly to the aromatic profile of the aimed wine. That would be of special application in the production of sparkling versus still wines, in addition to considering the TSS and acidity parameters. However, some canopy management operations usually performed in the vineyard, such as defoliation, may have a direct impact on the metabolism (either biosynthesis or catabolism) of some aroma compounds.<sup>66</sup> Understanding the evolution of grape aroma composition along ripening may help to take informed decisions about the suitability or potential impact of carrying out a given canopy management operation.

The bias can be defined as the average difference between the spectroscopy-predicted value and the real one. A positive bias means that, on average, the model is over-estimating the

composition of a specific compound by this amount whilst a negative value reflects underestimation.

Finally, the values of SEC, SECV, and SEP, which are the calibration, cross-validation, and prediction errors, respectively, can be observed in Table 2. The minimum values of SEC, SECV, and SEP were presented by  $\beta$ -ionone, being 0.0061  $\mu\text{g/L}$ , 0.0079  $\mu\text{g/L}$ , and 0.06  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The maximum values were presented by 2-hexen-1-ol, being 268.70  $\mu\text{g/L}$ , 329.40  $\mu\text{g/L}$ , and 872.51  $\mu\text{g/L}$ , respectively. The removal of outliers reduced the range of concentrations covered by the models, leaving out of this range some samples of the prediction set (destined for external prediction). This caused a decrease in the prediction accuracy of samples outside this range, increasing the SEP.

In TSS, the PLS factor was 11, the RPD<sub>CV</sub> was 4.35, the SEC was 0.55, the SECV was 0.79, and the SEP was 0.99. Furthermore,  $R^2_{CV}$  was > 0.9, so a non-invasive and non-contact model has been obtained that allows reliable, contactless quantification of °Brix throughout ripening.

Figure 3 shows the prediction models with a  $R^2_P \geq 0.5$  in NIR range. In order to facilitate the interpretation of the results, the prediction samples (red color) are plotted next to the calibration model (black color). As it can be seen in Table 2, the number of samples used for the construction of the calibration models (four-fold cross-validation), which are represented in black, were: 153 for  $\alpha$ -terpineol, 163 for total terpenoids, 157 for  $\beta$ -damascenone, 147 for  $\beta$ -ionone, 132 for 2-hexen-1-ol, 177 for 3-hexen-1-ol, 170 for total C<sub>6</sub> compounds, and 168 for total positive compounds. The red samples correspond to the set of samples used for the external prediction (Table 1). Considering the large number of samples used to perform the calibration models (black color), Fig. 3 shows that, for the volatile compounds represented, most of the calibration samples are in the lower concentration range (as is normal for grape volatile compounds), with a very small number of samples in higher concentration ranges. This is the reason why the models yielded greater error values, when making the external prediction (red color), in the samples that were in the highest concentration ranges. This fact is well observed in Fig. 3(a),(c),(d)–(h) where the external prediction samples with highest concentrations are outside the prediction intervals (dashed lines).

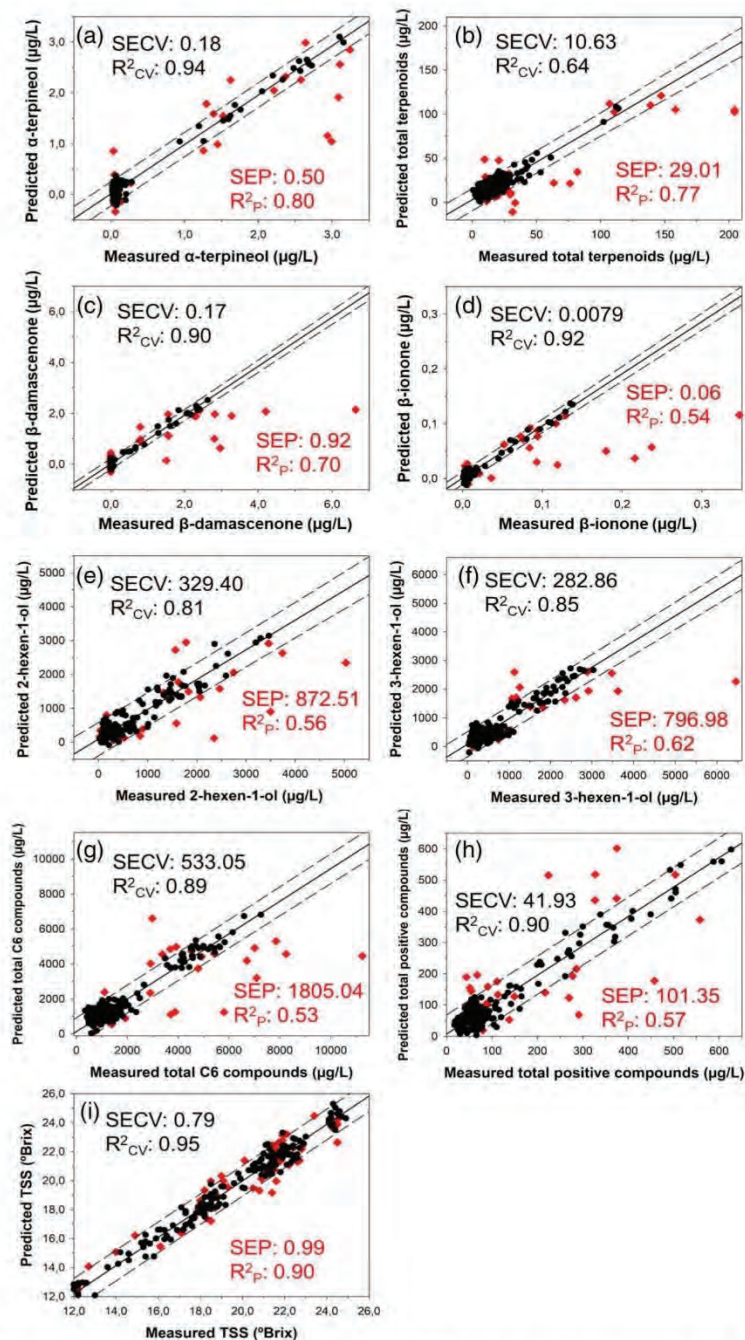
However, for the TSS (Fig. 3(i)), it can be observed how the calibration samples (black) are well distributed throughout the entire °Brix range, so that when it comes to external prediction (red), little error is made, which decreases the SEP.

In addition, the loadings of the best PLS prediction models of volatile compounds and TSS, for the NIR spectral range: 1100–2100 nm, are plotted in Fig. 4. It can be seen how the wavelengths showing the highest loading weights of the latent variables are mainly located between 1100–1200 nm, 1300–1450 nm and 1850–1950 nm. This agrees with the absorption peaks found in the spectra.

As mentioned in the introduction, there are very few studies that have monitored the aromatic composition of grape berries by NIR spectroscopy.

In a work of Boido *et al.*<sup>43</sup> the volatile compounds of 97 samples of *Vitis vinifera* L. Tannat grape berries (red) were evaluated. The RPD<sub>CV</sub> values obtained for volatile compounds in grape juice were > 2, except for two of the compounds. These RPD<sub>CV</sub> values were much lower than those obtained in our work. However, in the work of Ripoll *et al.*<sup>44</sup> the profile of volatile compounds was studied in 52 samples of *Vitis vinifera* L. Albariño grapes (white) during three stages of maturation. A total of 26 volatile



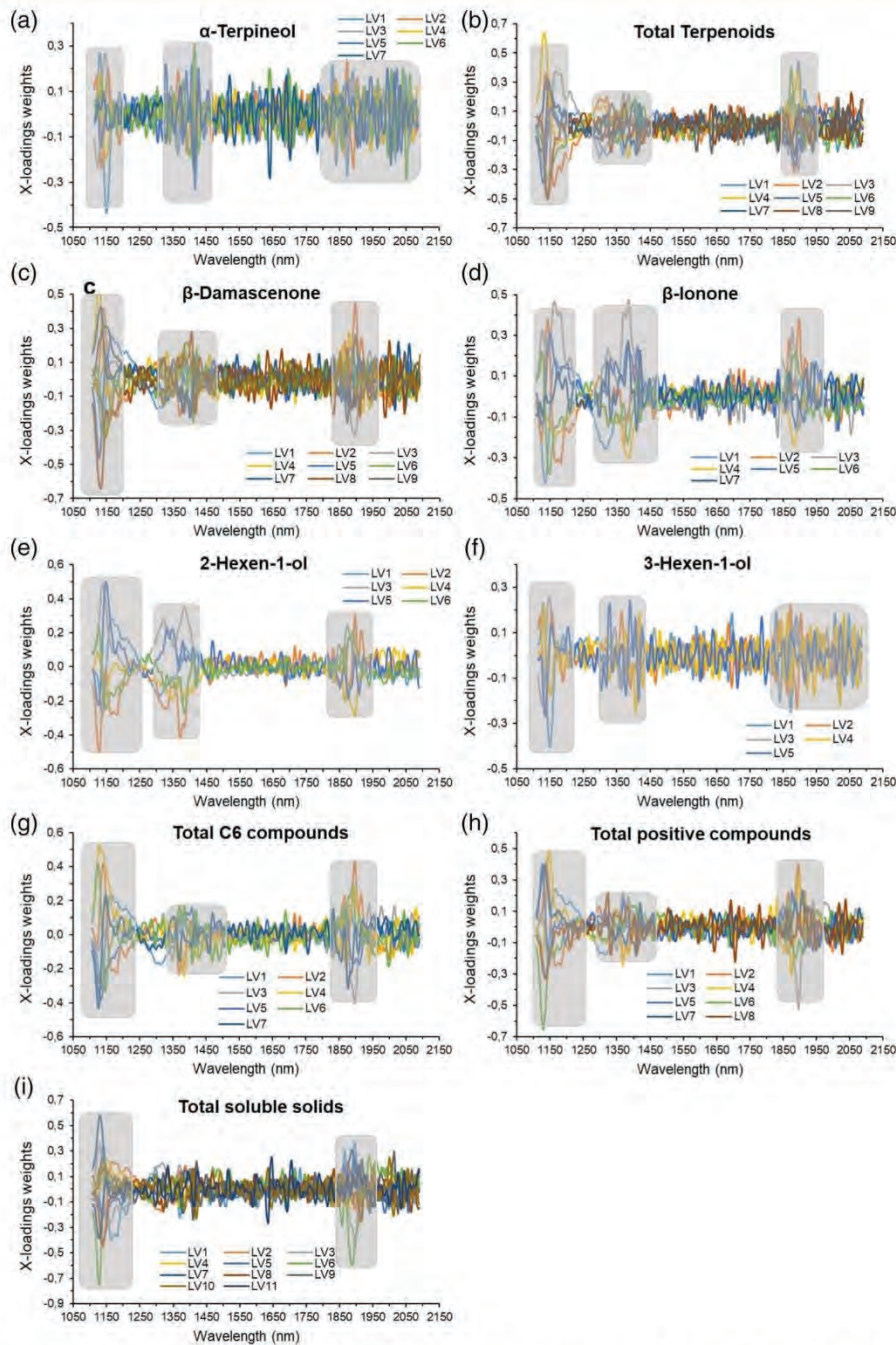


**Figure 3.** Regression plots for volatile compounds determination using the best PLS prediction models in the NIR range with  $R^2_p > 0.5$ : (a)  $\alpha$ -terpineol; (b) total terpenoids; (c)  $\beta$ -damascenone; (d)  $\beta$ -ionone; (e) 2-hexen-1-ol; (f) 3-hexen-1-ol; (g) total C6 compounds; (h) total positive compounds (the sum of all families except C6 compounds); and (i) total soluble solids (TSS). Correlation line (solid) and predictions intervals (dashed lines).

compounds were identified, some of which are common to those studied in the present work. In the work of Ripoll *et al.*<sup>44</sup> the  $RPD_{CV}$  values ranged from 0.88 and 1.69, while, in the present study, in which 240 samples were analyzed, the  $RPD_{CV}$  was greater than 1.47 in all cases.

In a recent work of Gehlken *et al.*<sup>45</sup> volatile compounds were measured from a total of 725 grape mash samples, divided into more than 15 red and white grape varieties. The  $R^2_{CV}$  values obtained ranged from 0.251 to 0.926. Although the volatile compounds studied are different from those studied in our work,





**Figure 4.** Loadings weight plots for all LVs of each volatile compounds and TSS determination using the best PLS prediction models in the NIR range. (a)  $\alpha$ -terpineol; (b) total terpenoids; (d)  $\beta$ -ionone; (c)  $\beta$ -damascenone; (e) 2-hexen-1-ol; (f) 3-hexen-1-ol; (g) total C6 compounds; (h) total positive compounds; and (i) total soluble solids (TSS). Gray areas indicate the highest loading weights.

some of them such as linalool, hexanal, 2-hexenal, and 1-hexanol are common. In general, it can be observed that, in the aforementioned work, the  $R^2_{CV}$  and  $RPD_{CV}$  values are lower than those obtained in the present work. Focusing on the white varieties in particular, 25 of the 26 aromatic compounds identified in these

varieties showed  $RPD_{CV}$  values less than 2, while most of the aromatic compounds identified in our work, showed  $RPD_{CV}$  values greater than 2, and even values greater than 3 in seven of them.

There are some works that evaluate TSS in grapes using NIR spectroscopy. In general, °Brix is a parameter that offers very good



results regardless of the NIR range, since sugars are found in very high concentrations in grapes. In the works found related to the grape varieties different to Tempranillo Blanco, the values of  $R^2_{CV}$ ,  $R^2_p$ , and  $RPD_{CV}$  for the TSS are, respectively: 0.91, not calculated, and 3.34;<sup>22</sup> 0.93, not calculated, and 3.31;<sup>67</sup> 0.74, not calculated, and not calculated;<sup>37</sup> 0.90, 0.91, and 3.36;<sup>30</sup> and 0.95, 0.91, and 4.27.<sup>12</sup> However, to the best of our knowledge this is the first work applying NIR spectroscopy to estimate the aromatic composition and TSS in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries.

Based on the results obtained in the present work, the wine-grower will be able to differentiate between high, medium, and low values of volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco grapes, as well as to quantify the TSS in a very reliable and accurate way, simultaneously. If the device is transported to the vineyard, it can track aromatic and technological maturity throughout the berry ripening period, as attempted by Fernández-Novales *et al.*<sup>68</sup> These authors estimated the TSS and the total amounts of anthocyanins and phenolics in Tempranillo berries from NIR spectroscopy acquired from a moving vehicle directly in the vineyard. This will enable estimating the harvest date more accurately according to oenological needs. In addition, if the device is installed in the winery, it could help to separate the grapes according to their aromatic quality, or their sugar content, creating fermentation tanks with different aromatic profiles, and finally obtaining wines with different characteristics and prices.

## CONCLUSIONS

A new methodology, based on non-invasive, contactless NIR spectroscopy, has been developed to estimate volatile compounds content, as well as TSS, in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco intact grape berries throughout ripening. According to the results obtained, the obtained models would help to discriminate between high, medium, and low values in all volatile compounds, total content by chemical families, and TSS. In addition, the built models would enable to quantify the concentration of most volatile compounds, their chemical families, and the TSS content along ripening in *Vitis vinifera* L. Tempranillo Blanco berries.

For the first time, an easy, solvent-free, and fast tool has been developed that enables the estimation of technological and aromatic maturities simultaneously and non-invasively at different stages of ripening.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Sandra Marín-San Román: formal analysis, investigation, methodology, and writing – original draft. Juan Fernández-Novales: conceptualization, investigation, data curation, supervision, and writing – review and editing. Cristina Cebrián-Tarancón: data curation, methodology, and writing – review and editing. Rosario Sánchez-Gómez: data curation, methodology, and writing – review and editing. María Paz Diago: conceptualization, investigation, supervision, funding acquisition, and writing – review and editing. Teresa Garde-Cerdán: conceptualization, investigation, supervision, funding acquisition, and writing – review and editing.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was given by the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades under the project RTI2018-096549-B-I00. Sandra Marín-San Román thanks Gobierno de La Rioja for her predoctoral contract.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## REFERENCES

- Aleixandre-Tudo JL, Weightman C, Panzeri V, Nieuwoudt HH and Du TWJ, Effect of skin contact before and during alcoholic fermentation on the chemical and sensory profile of south African chenin blanc white wines. *South African J Enol Vitic* **36**:366–377 (2015).
- Gambetta JM, Bastian SEP, Cozzolino D and Jeffery DW, Factors influencing the aroma composition of chardonnay wines. *J Agric Food Chem* **62**:6512–6534 (2014).
- Marín-San Román S, Rubio-Bretón P, Pérez-Álvarez EP and Garde-Cerdán T, Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Res Int* **137**:1–13 (2020).
- Castro-Mejías R, Natera-Marín R, Durán-Guerrero E and García-Barroso C, Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *Eur Food Res Technol* **228**:1–18 (2008).
- López-Tamames E, Carro-Mariño N, Ziya Y, Sapis C, Baumes RL and Bayonove C, Potential aroma in several varieties of Spanish grapes. *J Agric Food Chem* **45**:1729–1735 (1997).
- Martínez J, Rubio-Bretón P, Eva Vicente M and Enrique García-Escudero y, Influencia del terroir en el perfil aromático de Tempranillo Blanco en la D.O.Ca Rioja, in *E3S Web Conferences*, Vol. **50**, p. 2003 (2018). doi:10.1051/e3sconf/20185002003
- Garde-Cerdán T, Rubio-Bretón P, Marín-San Román S, Baroja E, Sáenz de Urturi I and Pérez-Álvarez EP, Study of wine volatile composition of Tempranillo versus Tempranillo Blanco, a new white grape variety. *Beverages* **7**:1–12 (2021).
- Ayestarán B, Martínez-Lapuente L, Guadalupe Z, Canals C, Adell E and Vilanova M, Effect of the winemaking process on the volatile composition and aromatic profile of Tempranillo Blanco wines. *Food Chem* **276**:187–194 (2019).
- Garde-Cerdán T, da Costa NL, Rubio-Bretón P, Barbosa R, Baroja E, Martínez-Vidaurre JM *et al.*, The Most important parameters to differentiate Tempranillo and Tempranillo Blanco grapes and wines through machine learning. *Food Anal Methods* **14**:2221–2236 (2021).
- De CMBM, Del BVL, Gómez-Alonso S, García-Romero E and Hermosín I, Sensory descriptive and comprehensive GC–MS as suitable tools to characterize the effects of alternative winemaking procedures on wine aroma. Part I: BRS Carmem and BRS Violeta. *Food Chem Elsevier* **272**:462–470 (2019).
- Kataoka H, Lord HL and Pawliszyn J, Applications of solid-phase micro-extraction in food analysis. *J Chromatogr A Elsevier* **880**:35–62 (2000).
- Fernández-Novales J, Garde-Cerdán T, Tardáguila J, Gutiérrez-Gamboa G, Pérez-Álvarez EP and Diago MP, Assessment of amino acids and total soluble solids in intact grape berries using contactless Vis and NIR spectroscopy during ripening. *Talanta Elsevier BV* **199**:244–253 (2019).
- Genisheva Z, Quintelas C, Mesquita DP, Ferreira EC, Oliveira JM and Amaral AL, New PLS analysis approach to wine volatile compounds characterization by near infrared spectroscopy (NIR). *Food Chem Elsevier* **246**:172–178 (2018).
- Ramos MC and Martínez de Toda F, Variability in the potential effects of climate change on phenology and on grape composition of Tempranillo in three zones of the Rioja DOCa (Spain). *Eur J Agron Elsevier* **115**:126014 (2020).
- Cataldo E, Fucile M and Mattii GB, Effects of kaolin and shading net on the ecophysiology and berry composition of sauvignon blanc grapevines. *Agriculture* **12**:1–21 (2022).
- Martín-Verástegui B, *Influencia del cambio climático en el terroir y en los vinos de una zona de Ribera del Duero*. Univ. Valladolid. Esc. Técnica Super. Ing. Agrar (2019).
- Benelli A, Cevoli C and Fabbri A, In-field Vis/NIR hyperspectral imaging to measure soluble solids content of wine grape berries during ripening, in *2020 IEEE International Workshop on Metrology for*



- Agriculture and Forestry (MetroAgriFor)*, pp. 99–103 (2020). doi: 10.1109/MetroAgriFor50201.2020.9277621
- 18 Boido E, Fariña L, Carrau F, Cozzolino D and Dellacassa E, Application of near-infrared spectroscopy/artificial neural network to quantify glycosylated norisoprenoids in Tannat grapes. *Food Chem* **387**:132927 (2022).
  - 19 Páscoa RNMJ, Porto PALS, Cerdeira AL and Lopes JA, The application of near infrared spectroscopy to wine analysis: an innovative approach using lyophilization to remove water bands interference. *Talanta Elsevier B.V.* **214**:120852 (2020).
  - 20 Larrain M, Guesalaga AR and Agosin E, A multipurpose portable instrument for determining ripeness in wine grapes using NIR spectroscopy. *IEEE Trans Instrum Meas* **57**:294–302 (2008).
  - 21 Herrera J, Guesalaga A and Agosin E, Shortwave-near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes. *Meas Sci Technol* **14**:689–697 (2003).
  - 22 González-Caballero V, Sánchez MT, López MI and Pérez-Marín D, First steps towards the development of a non-destructive technique for the quality control of wine grapes during on-vine ripening and on arrival at the winery. *J Food Eng* **101**:158–165 (2010).
  - 23 Osborne BG, Fearn T and Hindle PT, *Practical NIR Spectroscopy: With Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical, London (1993).
  - 24 Almeida PV, Rodrigues RP, Mendes CVT, Szeląg R, Pietrzyk D, Klepacz-Smólka A *et al.*, Assessment of NIR spectroscopy for predicting biochemical methane potential of agro-residues – a biorefinery approach. *Biomass Bioenergy* **151**:106169 (2021).
  - 25 McClure WF, 204 years of near infrared technology: 1800–2003. *J Near Infrared Spectrosc* **11**:487–518 (2003).
  - 26 Barnaba FE, Bellincontro A and Mencarelli F, Portable NIR-AOTF spectroscopy combined with winery FTIR spectroscopy for an easy, rapid, in-field monitoring of Sangiovese grape quality. *J Sci Food Agric* **94**:1071–1077 (2014).
  - 27 Teixeira dos Santos CA, Páscoa RNMJ and Lopes JA, A review on the application of vibrational spectroscopy in the wine industry: From soil to bottle. *TRAC – Trends Anal Chem* **88**:100–118 (2017).
  - 28 Marten GC, Shenk JS and Barton FE, Near infrared spectroscopy (NIRS): reflectance analysis of forage quality. *USDA Agric Handb* **643**:1–114 (1989).
  - 29 Anjos O, Caldeira I, Roque R, Pedro SI, Lourenco S and Canas S, Screening of different ageing technologies of wine spirit by applications of near-infrared (NIR) spectroscopy and volatile quantification. *processes* **8**:1–18 (2020).
  - 30 Urraca R, Sanz-García A, Tardaguila J and Diago MP, Estimation of total soluble solids in grape berries using a hand-held NIR spectrometer under field conditions. *J Sci Food Agric* **96**:3007–3016 (2016).
  - 31 Sleep B, Mason S, Janik L and Mosley L, Application of visible near-infrared absorbance spectroscopy for the determination of soil pH and liming requirements for broad-acre agriculture. *Precis Agric Springer US* **23**:194–218 (2022).
  - 32 Ballesteros R, Intrigliolo DS, Ortega JF, Ramírez-Cuesta JM, Buesa I and Moreno MA, Vineyard yield estimation by combining remote sensing, computer vision and artificial neural network techniques. *Precis Agric Springer US* **21**:1242–1262 (2020).
  - 33 Muganu M, Paolucci M, Gnisci D, Barnaba FE, Bellincontro A, Mencarelli F *et al.*, Effect of different soil management practices on grapevine growth and on berry quality assessed by NIR-AOTF spectroscopy. *Acta Hort* **978**:117–125 (2013).
  - 34 Diezma-Iglesias B, Barreiro P, Blanco R and García-Ramos FJ, Comparison of robust modeling techniques on NIR spectra used to estimate grape quality. *Acta Hort* **802**:367–372 (2008).
  - 35 Martins RC, Barroso TG, Jorge P, Cunha M and Santos F, Unscrambling spectral interference and matrix effects in *Vitis vinifera* vis-NIR spectroscopy: towards analytical grade 'in vivo' sugars and acids quantification. *Comput Electron Agric Elsevier B.V.* **194**:106710 (2022).
  - 36 Garde-Cerdán T, Lorenzo C, Zalacain A, Alonso GL and Salinas MR, Using near infrared spectroscopy to determine haloanisoles and halophenols in barrel aged red wines. *LWT – Food Sci Technol Elsevier Ltd* **46**:401–405 (2012).
  - 37 Giovenzana V, Beghi R, Mena A, Civelli R, Guidetti R, Best S *et al.*, Quick quality evaluation of Chilean grapes by a portable vis/NIR device. *Acta Hort* **978**:93–100 (2013).
  - 38 Cebrián-Tarancón C, Fernández-Roldán F, Alonso GL and Salinas RM, Classification of vine-shoots for use as enological additives. *J Sci Food Agric* **102**:724–731 (2022).
  - 39 Garde-Cerdán T, Lorenzo C, Alonso G and Salinas MR, Near infrared spectroscopy: easy and rapid tool to determine different volatile compounds in wines. *Curr Bioact Compd* **7**:93–105 (2011).
  - 40 Lorenzo C, Garde-Cerdán T, Pedroza MA, Alonso GL and Salinas MR, Determination of fermentative volatile compounds in aged red wines by near infrared spectroscopy. *Food Res Int Elsevier Ltd* **42**:1281–1286 (2009).
  - 41 Garde-Cerdán T, Lorenzo C, Alonso GL and Rosario SM, Employment of near infrared spectroscopy to determine oak volatile compounds and ethylphenols in aged red wines. *Food Chem Elsevier Ltd* **119**:823–828 (2010).
  - 42 Smyth HE, Cozzolino D, Cynkar WU, Damberg RG, Sefton M and Gishen M, Near infrared spectroscopy as a rapid tool to measure volatile aroma compounds in Riesling wine: possibilities and limits. *Anal Bioanal Chem* **390**:1911–1916 (2008).
  - 43 Boido E, Fariña L, Carrau F, Dellacassa E and Cozzolino D, Characterization of glycosylated aroma compounds in Tannat grapes and feasibility of the near infrared spectroscopy application for their prediction. *Food Anal Methods* **6**:100–111 (2013).
  - 44 Ripoll G, Vazquez M and Vilanova M, Ultraviolet – visible – near infrared spectroscopy for rapid determination of volatile compounds in white grapes during ripening. *Cienc e Tec Vitivinic* **32**:53–61 (2017).
  - 45 Gehlken J, Pour Nikfardjam M and Zöhr C, Determination of aroma compounds in grape mash under conditions of tasting by on-line near-infrared spectroscopy. *Eur Food Res Technol Springer Berlin Heidelberg* **248**:2325–2337 (2022).
  - 46 Marín-San Román S, Carot-Sierra JM, Sáenz de Urturi I, Rubio-Bretón P, Pérez-Álvarez EP and Garde-Cerdán T, Optimization of thin film-microextraction (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds. *Anal Chim Acta Elsevier BV* **1226**:1–12 (2022).
  - 47 Sánchez-Gómez R, Zalacain A, Alonso GL and Salinas MR, Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds. *J Agric Food Chem* **62**:10861–10872 (2014).
  - 48 Shenk JS and Westerhaus MO, Routine operation, calibration, development and network system management manual. *NIRSystems Inc, Silver Spring* **3** (1995).
  - 49 Massart DL, Vandeginste EGM, Deming SN, Michotte Y, Kaufman L and Bertsch W, *Chemometrics: A Textbook* (1988).
  - 50 Naes T, Isaksson T, Fearn T and Davies T, *A user-friendly guide to Multivariate Calibration and Classification* (2017).
  - 51 Williams PC and Sobering DC, How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibration. *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*:185–188 (1996).
  - 52 Martin MA and Roberts S, An evaluation of bootstrap methods for outlier detection in least squares regression. *J Appl Stat* **33**:703–720 (2006).
  - 53 Rubio-Bretón P, Salinas MR, Nevares I, Pérez-Álvarez EP, del Álamo-Sanza M, Marín-San Román S *et al.*, Recent advances in the study of grape and wine volatile composition: varietal, fermentative, and aging aroma compounds, in *Food Aroma Evolution During Food Processing, Cooking, and Aging*, 1st ed. ed. by Bordiga M and Nolle LML. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 439–463 (2019).
  - 54 Darriet P, Thibon C and Dubourdiou D, Aroma and aroma precursors in grape berry. *Biochemistry Grape Berry*:111–136 (2012). doi: 10.2174/978160805360511201010111
  - 55 González-Barreiro C, Rial-Otero R, Cancho-Grande B and Simal-Gándara J, Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Crit Rev Food Sci Nutr* **55**:202–218 (2015).
  - 56 Black CA, Parker M, Siebert TE, Capone DL and Francis IL, Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Aust J Grape Wine Res* **21**:582–600 (2015).
  - 57 Mendes-Pinto MM, Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma. *Arch Biochem Biophys Elsevier Inc* **483**:236–245 (2009).
  - 58 Styger G, Prior B and Bauer FF, Wine flavor and aroma. *J Ind Microbiol Biotechnol* **38**:1145–1159 (2011).
  - 59 Gutiérrez-Gamboa G, Garde-Cerdán T, Rubio-Bretón P and Pérez-Álvarez EP, Seaweed foliar applications at two dosages to Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) grapevines in two seasons: effects on grape and wine volatile composition. *Food Res Int Elsevier Ltd* **130**:108918 (2020).
  - 60 Robinson AL, Boss PK, Solomon PS, Trengove RD, Heymann H and Ebeler SE, Origins of grape and wine flavor. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. *Am J Enol Vitic* **1**:1–24 (2014).



- 61 Garde-Cerdán T, Santamaría P, Rubio-Bretón P, González-Arenzana L, López-Alfaro I and López R, Foliar application of proline, phenylalanine, and urea to Tempranillo vines: effect on grape volatile composition and comparison with the use of commercial nitrogen fertilizers. *LWT – Food Sci Technol* **60**:684–689 (2015).
- 62 García E, Chacón JL, Martínez J and Izquierdo PM, Changes in volatile compounds during ripening in grapes of Airén, Macabeo and chardonnay white varieties grown in La Mancha region (Spain). *Food Sci Technol Int* **9**:33–41 (2003).
- 63 Marín-San Román S, Garde-Cerdán T, Baroja E, Rubio-Bretón P and Pérez-Álvarez EP, Foliar application of phenylalanine plus methyl jasmonate as a tool to improve grenache grape aromatic composition. *Sci Hortic (Amsterdam)* Elsevier **272**:109515 (2020).
- 64 Alem H, Rigou P, Schneider R, Ojeda H and Torregrosa L, Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review. *J Sci Food Agric* **99**:975–985 (2018).
- 65 D'Onofrio C, Matarese F and Cuzzola A, Effect of methyl jasmonate on the aroma of Sangiovese grapes and wines. *Food Chem Elsevier* **242**:352–361 (2018).
- 66 Cataldo E, Salvi L, Paoli F, Fucile M and Mattii GB, Effect of agronomic techniques on aroma composition of white grapevines: a review. *Agronomy* **11**:1–19 (2021).
- 67 Bellincontro A, Cozzolino D and Mencarelli F, Application of NIR-AOTF spectroscopy to monitor Aleatico grape dehydration for Passito wine production. *Am J Enol Vitic* **62**:256–260 (2011).
- 68 Fernández-Novales J, Tardáguila J, Gutiérrez S and Diago MP, On-the-go VIS + SW – NIR spectroscopy as a reliable monitoring tool for grape composition within the vineyard. *Molecules* **24**:1–15 (2019).



**4.3.3. Artículo 5: Uso de la imagen hiperespectral (HSI) para la predicción de la composición volátil y los TSS en bayas de Tempranillo**

*Título:* Use of the hyperspectral imaging to estimate the volatile composition of Tempranillo grape berries during ripening

*En preparación para su envío a:* Scientia Horticulturae

*Autores:* Marín-San Román et al.

*Resumen*

El uso de la imagen hiperespectral (HSI), en el rango VIS+SW-NIR (400-1.000 nm), se ha evaluado en este trabajo para la estimación de la composición aromática y de los sólidos solubles totales (TSS) en bayas de *Vitis vinifera* L. Tempranillo en distintos momentos de maduración. El objetivo principal fue encontrar una herramienta que permita estimar la madurez tecnológica y aromática de forma simultánea, rápida y no invasiva, en cualquier momento de la maduración.

Para ello se adquirieron 240 espectros de bayas intactas en el laboratorio mediante HSI, en los que se pudo observar cómo, en el rango visible (VIS), de 450 a 700 nm, había una zona con una alta absorbancia, relacionada generalmente con los compuestos fenólicos. Puesto que se trata de una variedad tinta, las antocianinas presentaban su máximo de absorción a 520 nm. En la región SW-NIR, se pudo distinguir un pico a 976 nm relacionado con el segundo sobretono del estiramiento del enlace O-H del agua. Los métodos de referencia utilizados fueron la TF-SPME-GC-MS para los compuestos volátiles y la refractometría para los TSS. Se identificaron y cuantificaron un total de 20 compuestos volátiles, dando concentraciones entre 0,00048 µg/L ( $\beta$ -damascenona) y 12.096,94 µg/L

#### 4. RESULTADOS

---

((E)-2-hexen-1-ol) y se midieron los TSS en las 240 muestras, cubriendo de 11,0 a 25,3 °Brix, abarcando desde bayas muy poco maduras a bayas sobremaduras.

Con los datos de referencia se construyeron modelos de calibración mediante MPLS. El modelo de calibración para los TSS proporcionó un valor de  $R^2_{cv} = 0,97$ , por lo que se demostró que el método desarrollado permitió cuantificarlos de forma excelente en bayas de Tempranillo. Al mismo tiempo, se obtuvieron valores de  $R^2_{cv} \geq 0,5$  para todos los compuestos volátiles excepto para  $\alpha$ -terpineol, benzaldehído y (E)-2-hexen-1-ol que alcanzaron valores de  $R^2_{cv} \geq 0,3$ . Estos resultados indicaron que los modelos de calibración permitieron diferenciar entre valores altos, medios y bajos de todos los compuestos volátiles, excepto los modelos que obtuvieron un  $R^2_{cv} \geq 0,3$  que discriminaron entre valores altos y bajos únicamente. El valor de  $RDV_{cv}$  para los distintos compuestos se situó entre 1,24 y 5,49. La evaluación del modelo de calibración mediante predicción externa proporcionó peores resultados, con valores del error estándar de la predicción (SEP, *Standard Error of Prediction*) mucho más altos que del error típico de validación cruzada (SECV, *Standard Error of Cross-Validation*), lo que indicó que sería necesario aumentar el número de muestras y el rango de concentraciones para predecir de forma precisa la composición volátil de muestras desconocidas de Tempranillo.

Los resultados obtenidos mostraron que los modelos de calibración construidos permitieron diferenciar entre valores altos, medios y bajos para la mayoría de compuestos volátiles en bayas de Tempranillo en distintos momentos de su maduración. Se puede afirmar que se ha desarrollado una nueva metodología, basada en HSI, que permitió estimar la madurez tecnológica, así como la madurez aromática, de forma simultánea, en cualquier momento de la maduración, hecho de gran utilidad para el viticultor y el bodeguero.



**4.3.4. Artículo 6: Uso de la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) para la predicción de la composición aromática y los TSS en bayas de Tempranillo**

*Título:* NIR spectroscopy for predicting the aroma potential of intact Tempranillo grape berries during ripening

*En preparación para su envío a:* Food Chemistry

*Autores:* Marín-San Román et al.

*Resumen*

El uso de la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) en el rango 1.100-2.100 nm se ha evaluado en este trabajo para la predicción de la composición aromática y de los sólidos solubles totales (TSS) en bayas de *Vitis vinifera* L. Tempranillo en distintos momentos de su maduración. El objetivo principal fue desarrollar una herramienta que permitiera estimar la madurez tecnológica y aromática de forma simultánea, rápida y no invasiva en cualquier momento de la maduración, con el fin de tener más información a la hora de realizar distintas prácticas vitícolas, de escoger el momento de vendimia, o de clasificar las bayas en el momento de recepción en bodega.

Se adquirieron en el laboratorio espectros de 240 muestras de bayas intactas mediante NIRS, donde se pudo observar un pico a 1.143 nm, asignado al segundo sobretono del enlace C-H, un pico a 1.450 nm relacionado con el segundo sobretono del enlace hidroxilo del agua y del etanol (O-H), y un tercer pico a 1.900 nm relacionado con la combinación de estiramiento y deformación del enlace O-H del agua. A partir de estas mismas muestras se identificaron y cuantificaron un total de 20 compuestos volátiles, con concentraciones entre 0,00048 µg/L ( $\beta$ -damascenona) y 12.096,94 µg/L ((E)-2-hexen-1-ol), mediante el

#### 4. RESULTADOS

---

método optimizado anteriormente TF-SPME-GC-MS, y se midieron los TSS en las 240 muestras mediante refractometría, cubriendo de 11,0 a 25,3 °Brix

Con los datos espectrales y químicos se construyeron los modelos de calibración mediante regresión por mínimos cuadrados (MPLS). Se obtuvieron valores de  $R^2_{cv} \geq 0,3$  para todos los compuestos, lo que permitió diferenciar entre valores altos y bajos de compuestos volátiles en uvas de Tempranillo. La predicción externa proporcionó peores resultados, con valores de SEP mucho más altos que de SECV, debido a que las muestras utilizadas para la construcción de los modelos de calibración no cubrían todo el rango de concentraciones que presentaban las muestras utilizadas para la predicción externa, por lo que aumentó el error de predicción (SEP).

Se ha avanzado en una nueva metodología, basada en NIRS, con un gran potencial para estimar la madurez tecnológica y la madurez aromática, de forma simultánea, durante la maduración de las bayas de Tempranillo. Sin embargo, para desarrollar todo ese potencial, es necesario seguir añadiendo muestras a los modelos de calibración con el fin de cubrir un mayor rango de concentraciones y, de esto modo, disminuir el error cometido en la predicción de muestras desconocidas.

# 5.

## DISCUSIÓN GLOBAL







## 5.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO

### 5.1.1. Optimización de los métodos de SBSE y <sup>m</sup>SBSE

La técnica de extracción mediante barrita agitadora absorbente (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction) fue introducida por primera vez en 1999 (Baltussen et al., 1999). Desde entonces ha sido ampliamente utilizada para el análisis de compuestos volátiles en distintas matrices como café (Bicchi et al., 2002), agua (Ochiai et al., 2008; Sampedro et al., 2009), vinagre (Marrufo-Curtido et al., 2012), fármacos (Scherer et al., 2019), etc. Por otro lado, la SBSE también ha sido utilizada en numerosas ocasiones en el análisis de compuestos volátiles en muestras de vino (Cacho et al., 2013; Doneva-Sapceska et al., 2011; Fang & Qian, 2006; Franc et al., 2009; Gómez-Caballero et al., 2013; Marín et al., 2005; Ubeda et al., 2016; Zalacain et al., 2007), etc. Sin embargo, se han encontrado menos trabajos que analicen el contenido de compuestos volátiles en muestras de uva o mosto (Carlomagno et al., 2016; Caven-Quantrill & Buglass, 2006, 2011; Pardo-García et al., 2014; Pedroza et al., 2010; Serrano de la Hoz et al., 2016; Vasile-Simone et al., 2017). En base a las condiciones utilizadas en estos artículos, se eligieron las condiciones a optimizar en el método de SBSE

De acuerdo con los resultados obtenidos en el *Apartado 4.1.1*, para la técnica SBSE se identificaron 22 compuestos que se dividieron en 5 componentes principales (PCs, *Principal Components*). Los compuestos con mayor peso en cada PC fueron: PC1: (Z)-3-hexen-1-ol, acetato de isoamilo, alcohol amílico, hexanal, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol, 1-hexanol, hexanoato de etilo y linalool; PC2:  $\alpha$ -terpineol, ácido octanoico, 2-feniletanol, geraniol y 2-etil-1-hexanol; PC3: decanoato de etilo,  $\beta$ -ionona, y octanoato de etilo; PC4: decanal, benzaldehído y

$\beta$ -damascenona; PC5: ácido hexanoico y alcohol isoamílico. En este estudio se observó que las mejores condiciones para extraer los compuestos pertenecientes al PC1 y al PC2 fueron espacio de cabeza (HS, *Head-Space*), agitando a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C y añadiendo 2,5 g de NaCl a la mitad del tiempo de extracción. Puesto que estas condiciones eran tan favorables para la extracción de los compuestos pertenecientes a los PCs 1 y 2, y no perjudicaban la extracción de los compuestos pertenecientes al resto de PCs, fueron las escogidas para la extracción de compuestos volátiles en mosto mediante SBSE. No se han encontrado trabajos que optimicen los mismos factores para la extracción de compuestos volátiles en mosto, y, puesto que pueden existir interacciones entre ellos, es difícil realizar una comparación precisa. Sin embargo, en el artículo de Vasile-Simone et al. (2017) se realizó un diseño factorial fraccionado de  $2^{5-1}$ , en el que estudiaron los factores tiempo de extracción, velocidad de agitación, volumen de muestra, longitud de la barra de agitación y porcentaje de NaCl. En este caso no obtuvieron interacciones entre los factores, por lo que trataron cada uno por individual, y al contrario que en la presente tesis doctoral, escogieron el menor tiempo de extracción. Por el contrario, en otro trabajo de Salinas et al. (2004), probaron distintos tiempos de extracción, 2, 4 y 6 horas, obteniendo como resultado que extrayendo durante 6 horas aumentaba la extracción de compuestos volátiles en las uvas, resultado que coincide con el obtenido en esta tesis doctoral. En otro trabajo de Martínez-Gil et al. (2011) probaron muestras de mosto centrifugado y sin centrifugar, en viales de distinto volumen, y a distintas temperaturas de extracción. Para las muestras de mosto centrifugado en viales de 20 mL, que son las condiciones utilizadas en esta tesis, obtuvieron que se producía mayor extracción a temperaturas más altas, resultado contrario al obtenido en esta tesis.

La técnica de extracción <sup>m</sup>SBSE es una variante de SBSE que combina una extracción simultánea realizada en dos modos: inmersión directa (DI, *Direct*

*Immersion*) con un *Twister* de polidimetilsiloxano (PDMS), y HS con un *Twister* recubierto de etilenglicol (EG) (Ochiai et al., 2013). El EG tiene mayor afinidad por los compuestos polares que PDMS, por lo que la combinación de ambos podría cubrir un mayor rango de polaridades, y solventar de este modo el problema que presenta la SBSE con este tipo de analitos. La <sup>m</sup>SBSE se ha utilizado para el análisis de compuestos volátiles en muestras acuosas (Ochiai et al., 2013), bebidas (Ochiai, 2018), y cultivos bacterianos (Berrou et al., 2019), y únicamente se ha encontrado un trabajo que utilice la <sup>m</sup>SBSE para la extracción de compuestos volátiles en muestras de vino (Vyviurska et al., 2022). No se han encontrado trabajos que utilicen la <sup>m</sup>SBSE para el estudio de la composición volátil en muestras de uva o mosto, y mucho menos trabajos en las que se optimice.

En base a los resultados presentados en el *Apartado 4.1.1*, con la técnica <sup>m</sup>SBSE se identificaron un total de 25 compuestos volátiles divididos en 7 PCs. Los compuestos con mayor peso en PC1 fueron: hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de isoamilo,  $\beta$ -ionona, decanoato de etilo,  $\alpha$ -terpineol y benzaldehído. PC2: 1-hexanol, (E)-2-hexen-1-ol, alcohol isoamílico, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanal y (E)-2-hexenal. PC3: ácido octanoico, 2-feniletanol y  $\beta$ -damascenona. PC4: decanal y ácido hexanoico. PC5: furanmetanol y linalool. PC6: alcohol amílico. PC7: jasmonato de metilo y 2-etil-1-hexanol. Se observó que para los compuestos pertenecientes al PC1 las mejores condiciones de extracción fueron la interacción de 20 °C sin NaCl, para el PC2 fueron 6 horas de extracción y 60 °C, para el PC3 la interacción de 6 horas de extracción con 60 °C, para el PC4 fueron 60 °C y sin añadir NaCl, y para el PC5 fueron 6 horas de extracción, el resto de factores e interacciones no fueron significativos. Para los compuestos pertenecientes a PC6 y PC7 no hubo ningún factor ni interacción significativa. Se puede observar cómo el factor velocidad de agitación no fue significativo en ningún momento, tampoco lo fueron las interacciones en las que intervenía este factor, ni la interacción entre el tiempo de extracción y la adición de sal.

Finalmente se eligieron las condiciones que maximizaban la extracción de la mayoría de los compuestos, sin perjudicar en exceso la extracción de ninguno de ellos, siendo agitación a 500 rpm, durante 6 horas, a 60 °C sin NaCl.

Por último, se compararon los métodos SBSE y <sup>m</sup>SBSE (*Tabla 8.1. del Anexo II, corrección de la Tabla 6 del Artículo 1*) donde las condiciones óptimas elegidas para la SBSE proporcionan mejores extracciones para linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol,  $\beta$ -ionona, 2-feniletanol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, ácido octanoico, ácido hexanoico, acetato de isoamilo, alcohol amílico, (Z)-3-hexen-1-ol, hexanal, 1-hexanol, (E)-2-hexenal, (E)-2-hexen-1-ol, 2-etil-1-hexanol y heptanal. Por lo tanto, se puede concluir que la SBSE bajo las condiciones: HS, agitando a 500 rpm durante 6 h a 20 °C y con adición de NaCl a la mitad del tiempo de extracción, proporciona una mayor extracción de compuestos volátiles que la <sup>m</sup>SBSE. Estos resultados no coinciden con lo encontrados en la literatura donde la <sup>m</sup>SBSE muestra mejores recuperaciones para la mayoría de compuestos volátiles que la SBSE (Ochiai, 2018; Ochiai et al., 2013).

### 5.1.2. Optimización del método TF-SPME con las fases absorbentes de PDMS/CAR y PDMS/DVB

La técnica de microextracción en fase sólida mediante tira de malla de carbono o película fina (TF-SPME, *Thin Film-Solid Phase Microextraction*) fue mencionada por primera vez por Bruheim et al. (2003) con el objetivo de mejorar la sensibilidad de métodos anteriores como SPME o SBSE. Una de las principales ventajas que presenta frente a la SBSE es que su fase absorbente está compuesta por más de un material, por lo que aumenta el rango de polaridades de los compuestos a extraer. En esta tesis doctoral se han optimizado las fases absorbentes compuestas por PDMS/Carboxeno (PDMS/CAR) y de PDMS/Divinilbenceno (PDMS/DVB). TF-SPME ha sido utilizada para la extracción de compuestos orgánicos volátiles en agua (Emmons et al., 2020;



Huang et al., 2020; Piri-Moghadam et al., 2017, 2018), en aceite (Gruszecka et al., 2021; Segura-Borrego et al., 2020), en aire (Murtada et al., 2021) y en un vial generador de gases (Grandy et al., 2020), para la extracción de edulcorantes artificiales en agua (Cárdenas-Soracá et al., 2020), para la identificación de compuestos sin olor en productos de papel (Kfoury, Stuff, et al., 2021), y para la extracción de compuestos aromáticos, en distintas bebidas (Kfoury, Whitecavage, et al., 2021; Stuff et al., 2018), en cerveza (Marsili & Laskonis, 2019) y muestras de comida como chocolate, queso azul y crema de queso con sabor a fresa (Vernarelli et al., 2019). Sin embargo, no se ha utilizado ni optimizado nunca para la extracción de compuestos volátiles aromáticos en muestras de mosto.

Se identificaron un total de 26 compuestos volátiles con cada una de las fases absorbentes, como se puede comprobar en los resultados mostrados en el *Apartado 4.1.2*. Para poder elegir las mejores condiciones de cada absorbentes, fue necesario el uso del análisis estadístico. En primer lugar, se llevó a cabo un PCA, y en segundo lugar un ANOVA multifactorial. Para la fase absorbente de PDMS/CAR, se obtuvieron un total de 6 PCs. El PC1 estaba formado por los compuestos  $\alpha$ -terpineol, linalool, geraniol,  $\beta$ -damascenona,  $\beta$ -ionona, octanoato de etilo, decanoato de etilo y decanal. El PC2 por heptanal, benzaldehído, ácido hexanoico y 2-etil-1-hexanol. El PC3 por (Z)-3-hexen-1-ol, (E)-2-hexen-1-ol, 1-hexanol y hexanal. El PC4 por acetato de isoamilo y hexanoato de etilo. El PC5 por jasmonato de metilo y (E)-2-hexenal y el PC6 por furanmetanol, ácido octanoico y 2-feniletanol. Tras la realización del ANOVA multifactorial, se pudo comprobar que para PC1 y PC3 solo fue significativo el tiempo de extracción, el resto de factores no mostró diferencias significativas en la extracción. Para PC2 fue significativa la interacción entre el modo y el tiempo de extracción. En PC4 fueron significativos los factores modo de extracción y la temperatura de extracción. Por último, para PC5 fue significativa la interacción entre el modo de extracción y la velocidad de agitación. En el caso del PC6 ningún factor ni

## 5. DISCUSIÓN GLOBAL

---

interacción fue significativa. Teniendo en cuenta estos resultados, se escogieron las mejores condiciones dentro de los factores e interacciones que fueron significativas para cada PC. Finalmente, se eligieron las mejores condiciones buscando la maximización global de la extracción de compuestos volátiles con la fase absorbente de PDMS/CAR, que fueron inmersión directa (DI, *Direct Immersion*), agitando a 500 rpm, durante 6 horas a 20 °C.

El mismo proceso se repitió para la fase absorbente de PDMS/DVB, donde se obtuvieron un total de 7 PCs. El PC1 estaba formado por los compuestos acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, hexanal, (E)-2-hexenal, 1-hexanol y alcohol amílico. El PC2 por octanoato de etilo, decanoato de etilo,  $\beta$ -ionona y  $\beta$ -damascenona. El PC3 por 2-feniletanol, ácido octanoico,  $\alpha$ -terpineol y geraniol. El PC4 por (E)-2-hexen-1-ol, (Z)-3-hexen-1-ol y ácido hexanoico. El PC5 por acetol y furanmetanol. El PC6 por heptanal y alcohol isomílico. Por último, el PC7 estaba formado por el 2-etil-1-hexanol. Para los compuestos del PC1, las interacciones modo y tiempo de extracción, modo y temperatura de extracción, y tiempo y temperatura de extracción fueron significativas. Para los compuestos que forman el PC2, mostraron diferencias significativas los factores tiempo de extracción y temperatura de extracción. Para el PC3 fue significativo el modo de extracción. Para el PC4 fue significativa la temperatura de extracción. Para el resto de PCs no hubo ningún factor ni interacción de factores que fuera significativa. Tras escoger las mejores condiciones para cada PC, se eligieron las mejores condiciones globales, que, para el absorbente de PDMS/DVB, fueron HS, agitando a 500 rpm, durante 6 horas a 40 °C.

Por último, se realizó una comparación entre las condiciones óptimas de cada absorbente, es decir, para PDMS/CAR: DI, agitando a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C, y para PDMS/DVB: HS, agitando a 500 rpm, durante 6 horas a 40 °C. Se pudo concluir que la fase absorbente que proporcionó la mejor extracción de

compuestos volátiles fue la de PDMS/CAR actuando por DI, a 500 rpm, durante 6 horas a 20 °C. No existen trabajos en los que se utilice la técnica TF-SPME para extraer compuestos volátiles en muestras de mosto. Sin embargo, en un trabajo de Kfoury, Whitecavage, et al. (2021) comparan las tres fases absorbentes disponibles para esta técnica, entre las que se encuentran PDMS/CAR y PDMS/DVB, para la extracción de compuestos volátiles en bebidas. Obtuvieron como resultado que la fase absorbente de PDMS/CAR proporciona mejores resultados para compuestos orgánicos muy volátiles, mientras que PDMS/DVB muestra mejores resultados para compuestos orgánicos volátiles, y que ambas fases cubren un gran rango de polaridades. Estos resultados coinciden con los encontrados en otro trabajo de Grandy et al. (2020).

Por otro lado, en un trabajo de Segura-Borrego et al. (2020) compararon la eficacia de la técnica SBSE usando PDMS, con SBSE usando EG, con TF-SPME usando PDMS/CAR, con TF-SPME usando PDMS/DVB, y con TF-SPME utilizando las dos fases de forma simultánea PDMS/CAR y PDMS/DVB, para la extracción de compuestos volátiles en muestras de aceite de oliva virgen extra. Al contrario que en la presente tesis, los resultados fueron mejores para TF-SPME con la fase absorbente de PDMS/DVB que con la fase de PDMS/CAR. Sin embargo, obtuvieron que los mejores métodos de extracción fueron SBSE con el *Twister* de PDMS, y TF-SPME utilizando de forma simultánea las dos fases absorbentes. En el trabajo de Kfoury, Whitecavage, et al. (2021) en bebidas, así como en otro de Huang et al. (2020) en soluciones estándar, formadas por 40 compuestos volátiles del té disueltos en metanol, utilizan SBSE en combinación con TF-SPME. Para ello, usan un *Twister* de PDMS como agitador, y lo desorben de forma simultánea junto a la película fina, obteniendo, de este modo, una eficacia de extracción mejorada.

## *5. DISCUSIÓN GLOBAL*

---

Teniendo en cuenta los resultados encontrados en la bibliografía, y los obtenidos en esta tesis doctoral, cabe esperar que la combinación de SBSE junto con TF-SPME, así como el uso de TF-SPME combinando las fases absorbentes de PDMS/CAR y de PDMS/DVB, podrían proporcionar también muy buenos resultados a la hora de extraer compuestos volátiles en muestras de mosto, lo que sirve como aliciente para estudios y trabajos futuros.



## 5.2. USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO

Los trabajos que forman la presente tesis doctoral fueron los primeros que utilizaron tanto la imagen hiperespectral (HSI, *Hyperspectral Imagen*) en el rango visible + infrarrojo cercano de onda corta (VIS+SW-NIR) (400-1.000 nm), así como la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS, *Near Infrared Spectroscopy*) (1.100-2.100 nm), para la estimación de compuestos volátiles en uvas de Tempranillo Blanco y Tempranillo, a lo largo de su maduración. El objetivo principal de la construcción de los modelos de calibración mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS, *Modified Partial Least Squares*), fue obtener una ecuación de regresión o modelo de calibración para cada compuesto volátil y para los sólidos solubles totales (TSS, *Total Soluble Solids*), que permita estimar el valor de cada uno de ellos, en muestras totalmente desconocidas, y que ese valor difiera lo menos posible del valor real.

Tanto HSI como NIRS han sido ampliamente utilizadas en los últimos años para la evaluación de la calidad de muestras alimentarias. En el caso de HSI, ha sido empleada para estimar, en uvas, los TSS (Benelli et al., 2020, 2021; Fernández-Navales et al., 2021; Gao & Xu, 2022; Gomes, Mendes-Ferreira, et al., 2021; Gomes, Reis, et al., 2021; Gomes, Rendall, et al., 2021; Gutiérrez-Salcedo et al., 2019; Rodríguez-Pulido et al., 2022; Silva & Melo-Pinto, 2021; Xu, Sun, Yao, Wu, et al., 2022), los compuestos fenólicos (Fernández-Navales et al., 2021; Rodríguez-Pulido et al., 2022), las antocianinas (Fernández-Navales et al., 2021; Gomes, Rendall, et al., 2021; Gutiérrez-Salcedo et al., 2019; Rodríguez-Pulido et al., 2022), los amino ácidos, firmeza, pH (Fernández-Navales et al., 2021; Gomes, Mendes-Ferreira, et al., 2021; Gomes, Rendall, et al., 2021; Xu, Sun, Yao, Cai, et al., 2022), etc. Además se ha empleado para estimar la concentración de

## 5. DISCUSIÓN GLOBAL

---

compuestos volátiles en muestras de café tostado (Caporaso et al., 2022), huevos en conserva (Ren et al., 2021), y carne de cerdo curada (Aheto et al., 2020; Tian et al., 2021). Únicamente se ha encontrado un trabajo en el que se estime la composición aromática en variedades de uva blanca y tinta mediante HSI (Álvarez-Cid et al., 2015). Por otro lado la NIRS también ha sido ampliamente empleada para estimar, en las uvas, los TSS (Barnaba et al., 2014; Diezma-Iglesias et al., 2008; Fernández-Navales et al., 2019; González-Caballero et al., 2010; Kalopesa et al., 2023; Larraín et al., 2008; Martins et al., 2022; Urraca et al., 2016), ácidos (Martins et al., 2022), los compuestos fenólicos (Barnaba et al., 2014; Fernández-Navales et al., 2011; Ferrer-Gallego et al., 2022), los aminoácidos (Fernández-Navales et al., 2019), las antocianinas (Barnaba et al., 2014), el pH (González-Caballero et al., 2010; Larraín et al., 2008), el estado hídrico de la planta (Fernández-Navales et al., 2018), así como para el análisis de calidad y clasificación en otras matrices alimentarias (Tahir et al., 2019; L. Wang et al., 2017). La NIRS también ha sido utilizada para estimar la concentración de compuestos volátiles en muestras de vino (Garde-Cerdán et al., 2010, 2011; Genisheva et al., 2018; Lorenzo et al., 2009; Smyth et al., 2008; Summerson et al., 2020), y de uva (Boido et al., 2013, 2022; Gehlken et al., 2022, 2023; Ripoll et al., 2017; Summerson et al., 2020).

A la evidencia respaldada por todas estas investigaciones previas, se le sumó la necesidad de disponer de una herramienta que permitiera estimar la madurez aromática y la madurez tecnológica de las uvas de forma rápida y simultánea, hecho que hasta ahora no era posible, lo que sirvió como impulso para la realización de la investigación que forma la presente tesis doctoral.

### 5.2.1. Evaluación del uso de HSI y NIRS para estimar la madurez aromática y tecnológica en bayas de Tempranillo Blanco

Para estimar la precisión de la ecuación o modelo de calibración calculado, el primer estadístico utilizado fue el error típico de validación cruzada (SECV, *Standar Error of Cross-Validation*), ya que es la mejor estimación individual de la capacidad de predicción de un modelo; y el segundo, el coeficiente de determinación de validación cruzada ( $R^2_{cv}$ ). El error típico de calibración (SEC, *Standar Error of Calibration*) no es un buen predictor de la precisión, ya que solo indica cómo se ajustan los valores de referencia a la ecuación de regresión calculada, y el error típico de predicción (SEP, *Standar Error of Prediction*) puede ser muy variable, dependiendo de los errores de laboratorio y de si las muestras de predicción están bien representadas en el conjunto de calibración (Shenk & Westerhaus, 1996). Por lo general, en colectivos de calibración con  $N \geq 100$  muestras, y con colectivos de predicción con  $N \geq 9$ , los valores de SECV y SEP deben ser menores o iguales a 1,30 veces el valor de SEC para que se considere una buena predicción. Por otro lado, según Shenk & Westerhaus (1996), un  $R^2 \geq 0,9$  indica una información cuantitativa excelente, un  $R^2$  entre 0,89 y 0,7 indica una buena información cuantitativa, un  $R^2$  entre 0,69 y 0,5 indica una buena separación de las muestras en valores altos, medios y bajos, un  $R^2$  entre 0,49 y 0,3 indica una buena separación de las muestras en valores altos y bajos, y un  $R^2$  menor que 0,29 no es más que una conjetura. Otro estadístico de interés es la desviación predictiva residual (RPD, *Residual Predictive Deviation*). Según Williams & Norris (2001), los modelos que muestran valores de RPD inferiores a 1,5 no son adecuados, mientras que los que muestran valores de RPD entre 1,5 y 2,0 son adecuados para diferenciar la variabilidad de los datos, los modelos con valores de RPD superiores a 2, muestran un rendimiento predictivo muy bueno, que se considera excelente cuando los valores de RPD superan el valor de 3.

## 5. DISCUSIÓN GLOBAL

---

En los resultados mostrados en el *Apartado 4.3.1*, obtenidos mediante HSI para la variedad Tempranillo Blanco, se puede observar cómo los valores de SECV fueron de 0,007-270,45  $\mu\text{g/L}$ , los de SEP de 0,047-749,38  $\mu\text{g/L}$ , y para el  $R^2_{cv}$  encontramos 11 parámetros con  $R^2_{cv} \geq 0,9$ , 9 parámetros con  $R^2_{cv}$  entre 0,70 y 0,89, y todos los demás parámetros con  $R^2_{cv}$  entre 0,50 y 0,69, excepto los ácidos grasos totales que presentan un  $R^2_{cv} = 0,3$ . Respecto al  $RDP_{cv}$ , 10 parámetros presentaron valores de  $RPD_{cv} \geq 3$ , otros 9 parámetros valores de  $RPD_{cv} \geq 2$ , y todos los demás, excepto los ácidos grasos, presentaron valores de  $RPD_{cv} \geq 1,5$ . Estos resultados demostraron que el modelo construido a partir de los datos adquiridos con esta novedosa técnica espectral, permite diferenciar entre valores altos, medios y bajos de concentración de todos los parámetros (excepto los ácidos grasos), e incluso cuantificar la concentración de 18 de ellos, en muestras de Tempranillo Blanco a lo largo de la maduración. En el único trabajo encontrado en el que estudia la eficacia de la HSI para la estimación de compuestos volátiles en uva blanca, se utilizaron 14 muestras, y no se realizó ni validación cruzada, ni predicción externa (Álvarez-Cid et al., 2015). Estos autores obtuvieron valores medios de  $R^2_c$  entre 0,430 y 0,765, valores muy inferiores a los obtenidos en la presente tesis. En el caso de los TSS, que es el parámetros más utilizado para estimar la madurez de la uva, el valor de los estadísticos fue: SECV = 0,42, SEP = 1,03,  $R^2_{cv} = 0,98$  y RPD = 8,19. Solo se ha encontrado un trabajo en el que estudien los TSS en uva blanca mediante HSI (Nogales-Bueno et al., 2014), donde se obtuvo un valor de SECV = 1,10, de SEP = 1,89 y un valor de  $RPD_{cv} = 3,81$ , lo que indica un modelo de calibración con una menor capacidad predictiva que el obtenido en la presente tesis.

En los resultados mostrados en el *Apartado 4.3.2*, obtenidos mediante NIRS para la variedad Tempranillo Blanco, se puede observar que los valores de SECV fueron de 0,0079-282,86  $\mu\text{g/L}$ , los de SEP de 0,06-872,51  $\mu\text{g/L}$ , y para el  $R^2_{cv}$  encontramos 8 parámetros con  $R^2_{cv} \geq 0,9$ , 13 parámetros con  $R^2_{cv}$  entre 0,70 y 0,89,



y todos los demás parámetros con  $R^2_{cv}$  entre 0,50 y 0,69. Respecto al  $RDP_{cv}$ , 7 parámetros presentaron valores de  $RPD_{cv} \geq 3$ , otros 13 parámetros valores de  $RDP_{cv} \geq 2$ , y todos los demás, excepto el citral, presentaron valores de  $RPD_{cv} \geq 1,5$ . En el caso de los TSS, el valor de los estadísticos fue:  $SECV = 0,79$ ,  $SEP = 0,99$ ,  $R^2_{cv} = 0,95$  y  $RPD = 4,35$ . En un trabajo de Kalopesa et al. (2023), estiman la concentración de TSS en uvas de Sauvignon-Blanc, obteniendo un valor de  $R^2 = 0,86$ , valor muy inferior a los obtenidos en la presente tesis para la estimación de los TSS mediante NIRS en Tempranillo Blanco. Los resultados obtenidos demostraron que el modelo construido a partir de los datos adquiridos con NIRS, permite cuantificar la concentración de 21 de ellos, y diferenciar entre valores altos, medios y bajos de los otros 4, en muestras de Tempranillo Blanco a lo largo de su maduración. Tan solo se han encontrado dos trabajos que utilicen la NIRS para la determinación de compuestos volátiles en uvas blancas. En el trabajo de Ripoll et al. (2017) se estudió el perfil de compuestos volátiles de 52 muestras de *Vitis vinifera* L. Albariño durante tres momentos de la maduración. Se identificaron un total de 26 compuestos volátiles, obteniendo valores de  $RPD_{cv}$  entre 0,88 y 1,69, valores muy inferiores a los obtenidos en la presente investigación. Por otro lado, en un trabajo muy reciente de Gehlken et al. (2022) se midieron los compuestos volátiles de un total de 725 muestras de mosto de uva, divididas en variedades blancas y tintas. En el caso de las variedades blancas, un compuesto obtuvo  $RPD_{cv} \geq 2$ , 16 compuestos presentaron valores de  $RDP_{cv}$  inferiores a 2, y los 9 restantes presentaron valores de  $RDP_{cv}$  inferiores a 1,5. Estos resultados son muy inferiores que los obtenidos en esta tesis para la estimación de compuestos volátiles en muestras de Tempranillo Blanco mediante NIRS.

### 5.2.2. Evaluación del uso de HSI y NIRS para estimar la madurez aromática y tecnológica en bayas de Tempranillo

En los resultados mostrados en el *Apartado 4.3.3*, obtenidos mediante HSI para la variedad Tempranillo, se puede observar que los valores de SECV fueron de 0,0015-284,13  $\mu\text{g/L}$ , los de SEP de 0,053-1159,26  $\mu\text{g/L}$ , y para el  $R^2_{cv}$  encontramos a los TSS con  $R^2_{cv} \geq 0,9$ , al (Z)-3-hexen-1-ol con  $R^2_{cv}$  entre 0,70 y 0,89, 11 parámetros con  $R^2_{cv}$  entre 0,50 y 0,69, y el resto con valores de  $R^2_{cv}$  entre 0,30 y 0,49. Respecto al  $RDP_{cv}$ , los TSS presentaron un valor de  $RDP_{cv} \geq 3$ , el (Z)-3-hexen-1-ol un valor de  $RDP_{cv} \geq 2$ , y 5 parámetros de los restantes presentaron valores de  $RDP_{cv} \geq 1,5$ . Estos resultados demostraron que el modelo construido a partir de los datos adquiridos mediante HSI, permitieron cuantificar la concentración de los TSS y el (Z)-3-hexen-1-ol, diferenciar entre valores altos, medios y bajos de 11 de los parámetros estudiados, y para el resto diferenciar entre valores altos y bajos, en muestras de Tempranillo a lo largo de la maduración. Como se ha mencionado al comienzo del *Apartado 5.2*, los TSS han sido ampliamente estudiados mediante HSI en uvas tintas (Benelli et al., 2020, 2021; Fernández-Navales et al., 2021; Gao & Xu, 2022; Gomes, Mendes-Ferreira, et al., 2021; Gomes, Reis, et al., 2021; Gomes, Rendall, et al., 2021; Gutiérrez-Salcedo et al., 2019; Rodríguez-Pulido et al., 2022; Silva & Melo-Pinto, 2021; Xu, Sun, Yao, Wu, et al., 2022), donde los resultados obtenidos de  $R^2_{cv}$  van desde 0,75 a 0,96, de  $R^2_p$  van desde 0,79 a 0,96 y de  $RDP_{cv}$  van desde 2,45 a 4,02. En la presente tesis se obtuvieron valores de  $R^2_{cv} = 0,97$ ,  $R^2_p = 0,93$  y  $RDP_{cv} = 5,49$ , resultados por lo general, superiores a los encontrados en la bibliografía. Esto puede deberse a que, para llevar a cabo este estudio, se recogieron muestras de uvas en distintas etapas de la maduración, abarcando de este modo un gran rango de  $^{\circ}\text{Brix}$ , yendo desde 11,00  $^{\circ}\text{Brix}$  en uvas poco maduras, a 25,30  $^{\circ}\text{Brix}$  característico de uvas sobremaduras.

En los resultados mostrados en el *Apartado 4.3.4*, obtenidos mediante NIRS para la variedad Tempranillo, se puede observar que los valores de SECV fueron de 0,0016-270,39  $\mu\text{g/L}$ , los de SEP de 0,054-1430,77  $\mu\text{g/L}$ , y para el  $R^2_{cv}$  encontramos a los TSS con un valor de  $R^2_{cv} \geq 0,9$ , al (Z)-3-hexen-1-ol y los compuestos C6 totales con valores de  $R^2_{cv}$  entre 0,70 y 0,89, 10 parámetros con valores de  $R^2_{cv}$  entre 0,50 y 0,69, y los 7 parámetros restantes con valores de  $R^2_{cv}$  entre 0,30 y 0,49. Respecto al  $RDP_{cv}$ , los TSS presentaron un valor de  $RDP_{cv} \geq 3$ , el (Z)-3-hexen-1-ol y los compuestos C6 totales presentaron valores de  $RDP_{cv} \geq 2$ , y 6 parámetros de los restantes presentaron valores de  $RDP_{cv} \geq 1,5$ . Existen muy pocos trabajos en la bibliografía en los que predicen la concentración de compuestos volátiles en uvas tintas mediante NIRS. En el trabajo de Boido et al. (2013) estudiaron los compuestos volátiles glicosilados de 97 muestras de uva de la variedad Tannat. Para la mayoría de los compuestos se obtuvieron valores de  $RDP_{cv}$  cercanos a 1, e inferiores a 1,5 en la mayoría de los casos, valores algo inferiores a los obtenidos en la presente tesis doctoral. En el trabajo de Gehlken et al. (2022) mencionado anteriormente, se estudiaban los compuestos volátiles de 725 muestras de mosto de uvas tintas y blancas. En dicho trabajo, para las uvas tintas, se obtuvieron valores de  $RDP_{cv} \geq 2$  en 4 de los 29 compuestos identificados, valores de  $RDP_{cv} < 2$  en 18 de ellos, y valores de  $RDP_{cv} < 1,5$  en los 7 restantes. Estos valores de  $RDP_{cv}$  son muy similares a los obtenidos en el trabajo que conforma la presente tesis doctoral, en el que se estiman los valores de compuestos volátiles de Tempranillo mediante NIRS.

Estos resultados demostraron que los modelos de calibración construidos a partir de los datos adquiridos con NIRS permiten cuantificar la concentración de los TSS, el (Z)-3-hexen-1-ol, y los compuestos C6 totales, diferenciar entre valores altos, medios y bajos de 10 de los parámetros estudiados, y para el resto diferenciar entre valores altos y bajos en muestras de Tempranillo durante su maduración. Los TSS también han sido ampliamente estudiados utilizando NIRS

## 5. DISCUSIÓN GLOBAL

---

en uvas tintas (Barnaba et al., 2014; Diezma-Iglesias et al., 2008; Fernández-Novales et al., 2019; González-Caballero et al., 2010; Kalopesa et al., 2023; Larraín et al., 2008; Martins et al., 2022; Urraca et al., 2016). Entre estos trabajos se encontraron valores de  $RPD_{cv}$  comprendidos entre 1,60 y 3,34, en la presente tesis doctoral, el valor de  $RPD_{cv}$  obtenido mediante el uso del NIRS para la estimación de TSS en uvas de Tempranillo fue de 3,74, resultado superior a los obtenidos en los trabajos referenciados. Por lo general, la estimación de los TSS mediante técnicas espectrales siempre da muy buenos resultados, esto puede ser debido a que estos compuestos se encuentran en la baya en muy altas concentraciones, por lo que se detectan fácilmente en todo el rango espectral.

Tras evaluar los distintos resultados obtenidos, se observó que los modelos calculados para la variedad Tempranillo, tanto con HSI como NIRS, mostraron una peor capacidad predictiva que los obtenidos para la variedad Tempranillo Blanco. Esto puede deberse a que la uva tinta tiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos que la uva blanca, y estos se encuentran en la uva en concentraciones mucho más altas (mg/L) que los compuestos volátiles (ng/L- $\mu$ g/L) (Garde-Cerdán, Rubio-Bretón, et al., 2021; Kizildeniz et al., 2022), por lo que pueden enmascararlos y disminuir la capacidad predictiva de los modelos obtenidos. Estas diferencias pueden observarse en los espectros de absorción, sobre todo en el espectro obtenido mediante HSI para la región VIS+SW-NIR. Esto se debe a que en el rango de 450 nm a 700 nm hay una región de alta absorbancia, generalmente relacionada con compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, estilbenos y flavonoides) (Diago et al., 2016; Fernández-Novales et al., 2011). Si se comparan los espectros obtenidos para Tempranillo Blanco (*Apartado 4.3.1*) con los obtenidos para Tempranillo (*Apartado 4.3.3*), se puede observar que en esta zona, la absorción en Tempranillo Blanco era mucho menor, debido a que las bayas de esta variedad se caracterizan por la pérdida de las antocianinas (Gutiérrez-Gamboa et al., 2020; Kizildeniz et al., 2022), compuestos flavonoides



que presentan su máximo de absorción a 520 nm (Diago et al., 2016; Fernández-Navales et al., 2011). En el artículo de Álvarez-Cid et al. (2015), en el que estiman la composición de compuestos volátiles mediante HSI, en el rango de 400-1.000 nm, para variedades de uva blancas y tintas, también obtienen medias de  $R^2$  superiores en las variedades blancas que en las tintas.

Por otro lado, se puede observar cómo los resultados obtenidos para HSI, en el rango VIS+SW-NIR (400-1.000 nm), y NIRS, en el rango de 1.100 nm a 2.100 nm fueron muy similares, siendo algo mejores los obtenidos mediante HSI en el rango VIS+SW-NIR. Estos resultados coinciden con los encontrados en el trabajo de Fernández-Navales et al. (2019), donde estiman la composición de aminoácidos en muestras de uva, mediante espectroscopía en el rango VIS+SW-NIR (570-998 nm), y en el rango NIR (1.100-2.100 nm), obteniendo resultados similares, pero algo superiores en el rango VIS+SW-NIR. Asimismo, se sabe que, mediante HSI se obtiene mayor información que mediante espectroscopía, debido a que HSI combina la espectroscopía con la imagen convencional, lo que es de gran utilidad para obtener información tanto cualitativa como cuantitativa (Amigo et al., 2013; Ye et al., 2023).

A pesar de eso, es posible aplicar tanto la HSI, en el rango VIS+SW-NIR (400-1.000 nm), como la NIRS, en el rango 1.100-2.100 nm, para clasificar las bayas, al menos, según su alto o bajo contenido en compuestos volátiles, y así poder estimar la fecha de vendimia en función de la madurez aromática, hecho que no era posible hasta el momento. Por otra parte, si se instalan estos dispositivos en la zona de recepción de la bodega, se podrían clasificar las bayas en varias categorías en función de su composición aromática, y añadirse a distintos depósitos de fermentación, para elaborar vinos con diferentes características aromáticas y calidades.

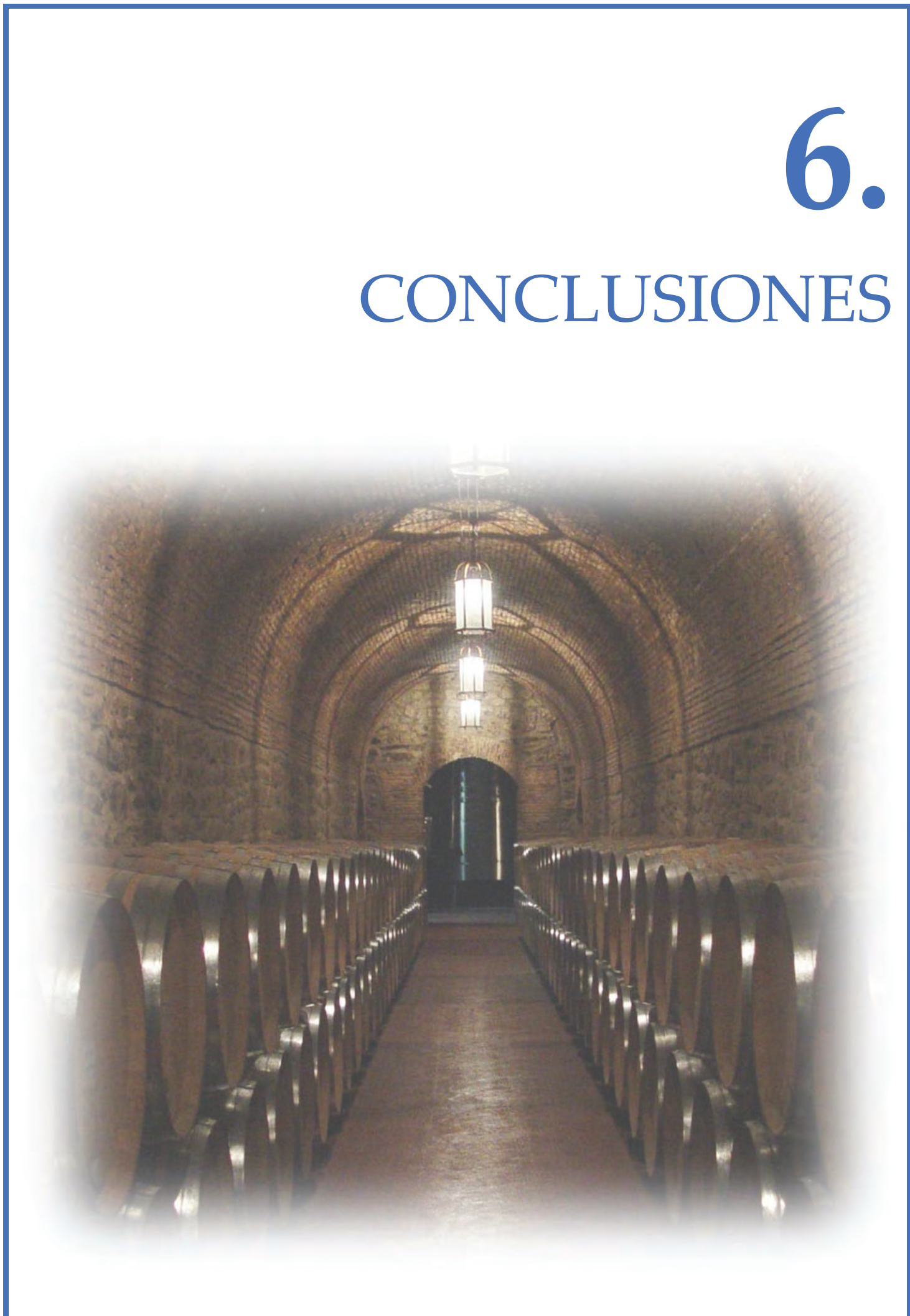
## 5. DISCUSIÓN GLOBAL

---

Sin embargo, en los cuatro trabajos en los que se muestran los resultados de los modelos de calibración calculados y su evaluación mediante predicción externa, especialmente en los trabajos de *Vitis vinifera* L. Tempranillo, se puede observar como varias muestras, utilizadas para la predicción externa, se encuentran fuera del rango de nuestro modelo de calibración, lo que aumenta el SEP. Este hecho demuestra la necesidad de seguir trabajando en la construcción de modelos más robustos, que contengan una mayor cantidad de muestras en todos los rangos de concentraciones, con el objetivo de poder predecir de forma precisa cualquier muestra de concentración desconocida.

# 6.

## CONCLUSIONES







## **6.1. OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN MOSTO**

1. Tanto el método de SBSE-GC-MS, como su variante <sup>m</sup>SBSE-GC-MS, y al igual que la TF-SPME-GC-MS proporcionaron una extracción adecuada de los compuestos volátiles del mosto.
2. Las mejores condiciones para la SBSE fueron: espacio de cabeza (HS), agitación a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C (T<sup>a</sup> ambiente) y añadiendo NaCl a mitad del tiempo de extracción (3h).
3. Las mejores condiciones para la <sup>m</sup>SBSE fueron: agitación a 500 rpm durante 6 horas a 60 °C y sin añadir NaCl.
4. Las mejores condiciones para TF-SPME con la fase absorbente de PDMS/CAR fueron: inmersión directa (DI) y agitación a 500 rpm durante 6 horas a 20 °C; con la fase absorbente de PDMS/DVB fueron: espacio de cabeza (HS) y agitación a 500 rpm durante 6 horas a 40 °C.
5. La técnica de SBSE realizó mejores extracciones, de la mayoría de compuestos volátiles identificados en el mosto, que la técnica de <sup>m</sup>SBSE.
6. La técnica de TF-SPME con la fase absorbente de PDMS/CAR proporcionó una mejor extracción, de la mayoría de compuestos volátiles identificados en el mosto, que cuando se utilizaba esta misma técnica con la fase absorbente de PDMS/DVB.

## **6.2. COMPARACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES OBTENIDAS CON LOS MÉTODOS DE SBSE y TF-SPME**

7. La técnica de TF-SPME, con la fase absorbente de PDMS/CAR, proporcionó una mejor extracción, de la mayoría de compuestos volátiles identificados en el mosto, que la técnica de SBSE.

### 6.3. USO DE LA HSI Y LA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LOS TSS EN BAYAS DE TEMPRANILLO BLANCO Y TEMPRANILLO

8. Se han desarrollado nuevas herramientas basadas en el uso de imágenes espectrales (HSI) en el rango VIS+SW-NIR (400-1.000 nm), y de espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) en el rango 1.100-2.100 nm, que permiten estimar, e incluso en ocasiones cuantificar, la composición volátil de las bayas de Tempranillo Blanco a lo largo de su maduración.
9. Tanto la HSI como la NIRS permiten diferenciar entre valores altos, medios y bajos de concentración de los compuestos volátiles identificados en las bayas de Tempranillo.
10. Se ha mostrado, por primera vez, que tanto la HSI como la NIRS permiten estimar la madurez tecnológica y la madurez aromática simultáneamente, de forma rápida, sin contacto y de manera no invasiva, en los diferentes estados de maduración de las bayas de Tempranillo Blanco y Tempranillo.
11. La HSI proporciona mejores predicciones que la NIRS. Esto puede deberse a que la HSI dispone de una mayor información química y espacial al combinar la espectroscopía con la imagen convencional.
12. Ambas tecnologías obtienen mejores resultados de predicción en Tempranillo Blanco que en Tempranillo, debido probablemente a que los compuestos fenólicos presentes en las uvas tintas se encuentran en mayor concentración (mg/L) que los compuestos aromáticos (ng/L- $\mu$ g/L) y, por tanto, pueden enmascararlos y disminuir la capacidad predictiva de los modelos obtenidos.
13. Los resultados obtenidos, tanto por HSI como por NIRS, en la predicción externa de la variedad Tempranillo, evidencian la necesidad de construir modelos con un mayor número de muestras y que cubran un mayor rango

### 6.3. Uso de la HSI y la NIRS para la predicción de la composición aromática

---

de concentraciones, con el objetivo de disminuir el error cometido en la predicción de muestras desconocidas.





# 7.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





### A

---

- Aheto, J. H., Huang, X., Tian, X. Y., Lv, R., Dai, C., Bonah, E., & Chang, X. (2020). Evaluation of lipid oxidation and volatile compounds of traditional dry-cured pork belly: The hyperspectral imaging and multi-gas-sensory approaches. *Journal of Food Process Engineering*, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13092>
- Alem, H., Rigou, P., Schneider, R., Ojeda, H., & Torregrosa, L. (2018). Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 975–985. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9327>
- Allen, M. S., & Lacey, M. J. (1999). Methoxypyrazines of grapes and wines. In A. L. Waterhouse & S. E. Ebeler (Eds.), *Chemistry of Wine Flavor* (pp. 31–38). American Chemical Society.
- Álvarez-Cid, M. X., García-Díaz, A., Rodríguez-Araújo, J., Asensio-Campazas, A., & Vilanova de la Torre, M. (2015). Goal-driven phenotyping through spectral imaging for grape aromatic ripeness assessment. In *Pattern recognition and image analysis. IbPRIA 2015* (Vol. 9117, pp. 272–280). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19390-8>
- Amigo, J. M. (2010). Practical issues of hyperspectral imaging analysis of solid dosage forms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(1), 93–109. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3828-z>
- Amigo, J. M., Martí, I., & Gowen, A. A. (2013). Hyperspectral imaging and chemometrics: a perfect combination for the analysis of food structure, composition and quality. In *Data Handling in Science and Technology* (Vol. 28, pp. 343–370). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00009-0>

### B

---

- Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737–747.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4)
- Barnaba, F. E., Bellincontro, A., & Mencarelli, F. (2014). Portable NIR-AOTF spectroscopy combined with winery FTIR spectroscopy for an easy, rapid, in-field monitoring of Sangiovese grape quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), 1071–1077. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6391>
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5), 772–777. <https://doi.org/10.1366/0003702894202201>
- Benelli, A., Cevoli, C., & Fabbri, A. (2020). In-field Vis/NIR hyperspectral imaging to measure soluble solids content of wine grape berries during ripening. *IEEE International Workshop on Metrology for Agriculture and Forestry*, 99–103. <https://doi.org/10.1109/MetroAgriFor50201.2020.9277621>
- Benelli, A., Cevoli, C., Ragni, L., & Fabbri, A. (2021). In-field and non-destructive monitoring of grapes maturity by hyperspectral imaging. *Biosystems Engineering*, 207, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2021.04.006>
- Berrou, K., Dunyach-Remy, C., Lavigne, J. P., Roig, B., & Cadere, A. (2019). Multiple stir bar sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a tentative identification of bacterial volatile and/or semi-volatile metabolites. *Talanta*, 195, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.042>
- Bicchi, C., Iori, C., Rubiolo, P., & Sandra, P. (2002). Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted Arabica coffee and coffee brew. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 449–459. <https://doi.org/10.1021/jf010877x>
- Blouin, J., & Peynaud, É. (2003). *Enología Práctica* (4ª). Mundi-Prensa.
- Boido, E., Fariña, L., Carrau, F., Cozzolino, D., & Dellacassa, E. (2022). Application of near-infrared spectroscopy/artificial neural network to quantify glycosylated



norisoprenoids in Tannat grapes. *Food Chemistry*, 387, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132927>

Boido, E., Fariña, L., Carrau, F., Dellacassa, E., & Cozzolino, D. (2013). Characterization of Glycosylated Aroma Compounds in Tannat Grapes and Feasibility of the Near Infrared Spectroscopy Application for Their Prediction. *Food Analytical Methods*, 6(1), 100–111. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9423-5>

Bruheim, I., Liu, X., & Pawliszyn, J. (2003). Thin-Film Microextraction. *Analytical Chemistry*, 75(4), 1002–1010. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ac026162q>

## C

---

Cacho, J., Campillo, N., Viñas, P., & Hernández-Córdoba, M. (2013). Stir bar sorptive extraction with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of resveratrol, piceatannol and oxyresveratrol isomers in wines. *Journal of Chromatography A*, 1315, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.045>

Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). The Aroma of Wine. In Y. H. Hui (Ed.), *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors* (pp. 303–317). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470622834.ch18>

Caporaso, N., Whitworth, M. B., & Fisk, I. D. (2022). Prediction of coffee aroma from single roasted coffee beans by hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 371, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131159>

Carbonell Bejerano, P., & Martínez-Zapater, J. M. (2013). Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. *Acenología*, 5–8. [http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/estructura\\_composicion\\_vino\\_cienc1013.htm](http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/estructura_composicion_vino_cienc1013.htm)

Cárdenas-Soracá, D. M., Singh, V., Nazdrajić, E., Vasiljević, T., Grandy, J. J., & Pawliszyn, J. (2020). Development of thin-film solid-phase microextraction coating and method for determination of artificial sweeteners in surface waters. *Talanta*, 211, 1–9.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120714>

- Carlomagno, A., Schubert, A., & Ferrandino, A. (2016). Screening and evolution of volatile compounds during ripening of 'Nebbiolo,' 'Dolcetto' and 'Barbera' (*Vitis vinifera* L.) neutral grapes by SBSE–GC/MS. *European Food Research and Technology*, 242(8), 1221–1233. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2626-4>
- Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., Durán-Guerrero, E., & García-Barroso, C. (2008). Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research and Technology*, 228(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0900-4>
- Caven-Quantrill, D. J., & Buglass, A. J. (2006). Comparison of micro-scale simultaneous distillation-extraction and stir bar sorptive extraction for the determination of volatile organic constituents of grape juice. *Journal of Chromatography A*, 1117(2), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.091>
- Caven-Quantrill, D. J., & Buglass, A. J. (2011). Comparison of volatile constituents extracted from model grape juice and model wine by stir bar sorptive extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(7), 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.078>
- Cen, H., & He, Y. (2007). Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.003>
- Chávez-Segura, G., & Vejarano, R. (2021). White grape quality monitoring via hyperspectral imaging: From the vineyard to the winery. In *White Wine Technology* (pp. 17–27). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00003-X>
- Ciurczak, E. W., Igne, B., Workman, J. J., & Burns, D. A. (Eds.). (2021). *Handbook of Near-Infrared Analysis* (4th ed.). Taylor & Francis.
- Cliff, M. A. (2001). Influence of wine glass shape on perceived aroma and colour intensity in wines. *Journal of Wine Research*, 12(1), 39–46.

<https://doi.org/10.1080/09571260120069741>

Coombe, B. G., & McCarthy, M. G. (1997). Identification and naming of the inception of aroma development in ripening grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3(1), 18–20. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00111.x>

Costa Freitas, A. M., Gomes da Silva, M. D. R., & Cabrita, M. J. (2012). Sampling techniques for the determination of volatile components in grape juice, wine and alcoholic beverages. In *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (Vol. 4, pp. 27–41). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00126-5>

## D

---

Darriet, P., Thibon, C., & Dubourdieu, D. (2012). Aroma and aroma precursors in grape berry. In H. Gerós, M. Chaves, & S. Delrot (Eds.), *The Biochemistry of the Grape Berry* (pp. 111–136). Bentham Books. <https://doi.org/10.2174/978160805360511201010111>

Diago, M. P., Fernández-Novales, J., Fernandes, A. M., Melo-Pinto, P., & Tardáguila, J. (2016). Use of visible and short-wave near-infrared hyperspectral imaging to fingerprint anthocyanins in intact grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(40), 7658–7666. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01999>

Diezma-Iglesias, B., Barreiro, P., Blanco, R., & García-Ramos, F. J. (2008). Comparison of robust modeling techniques on NIR spectra used to estimate grape quality. *Acta Horticulturae*, 802, 367–372. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.802.48>

Doneva-Sapceska, D., Sponholz, W. R., & Tasev, I. (2011). Analysis of volatile components in Riesling wines with and without enzyme treatment by SBSE-GC/MS technique. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 46(4), 409–418. <https://doi.org/10.4324/9781849776615>

Droulia, F., & Charalampopoulos, I. (2021). Future climate change impacts on european viticulture: a review on recent scientific advances. *Atmosphere*, 12(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/atmos12040495>

### E

---

- ElMasry, G., Barbin, D. F., Sun, D.-W., & Allen, P. (2012). Meat quality evaluation by hyperspectral imaging technique: an overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8), 689–711. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.507908>
- ElMasry, G., Kamruzzaman, M., Sun, D.-W., & Allen, P. (2012). Principles and applications of hyperspectral imaging in quality evaluation of agro-food products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(11), 999–1023. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.543495>
- Emmons, R. V., Liden, T., Schug, K. A., & Gionfriddo, E. (2020). Optimization of thin film solid phase microextraction and data deconvolution methods for accurate characterization of organic compounds in produced water. *Journal of Separation Science*, 43(9–10), 1915–1924. <https://doi.org/10.1002/jssc.201901330>

### F

---

- Fang, Y. L., & Qian, M. C. (2006). Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot Noir wines from different grape maturities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8567–8573. <https://doi.org/10.1021/jf061396m>
- Fernández-Navales, J. (2009). *Determinación de parámetros de calidad de uvas, mostos en fermentación, y vinos mediante espectroscopía ultravioleta-visible y de infrarrojo cercano*. Universidad de Córdoba.
- Fernández-Navales, J., Barrio, I., & Diago, M. P. (2021). Non-invasive monitoring of berry ripening using on-the-go hyperspectral imaging in the vineyard. *Agronomy*, 11(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/agronomy11122534>
- Fernández-Navales, J., Garde-Cerdán, T., Tardáguila, J., Gutiérrez-Gamboa, G., Pérez-Álvarez, E. P., & Diago, M. P. (2019). Assessment of amino acids and total soluble solids in intact grape berries using contactless Vis and NIR spectroscopy during ripening. *Talanta*, 199, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.037>



- Fernández-Navales, J., Sánchez, M. T., López, M. I., García-Mesa, J. A., & Ramírez, P. (2011). Feasibility of using a miniature fiber optic UV-VIS-NIR spectrometer to assess total polyphenol index, color intensity and volumic mass in red wine fermentations. *Journal of Food Process Engineering*, 34(4), 1028–1045. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00530.x>
- Fernández-Navales, J., Tardáguila, J., Gutiérrez-Salcedo, S., Marañón, M., & Diago, M. P. (2018). In field quantification and discrimination of different vineyard water regimes by on-the-go NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 165, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.08.018>
- Ferreira, V., & Lopez, R. (2019). The actual and potential aroma of winemaking grapes. *Biomolecules*, 9(12), 1–35. <https://doi.org/10.3390/biom9120818>
- Ferrer-Gallego, R., Rodríguez-Pulido, F. J., Toci, A. T., & García-Estevez, I. (2022). Phenolic composition, quality and authenticity of grapes and wines by vibrational spectroscopy. *Food Reviews International*, 38(5), 884–912. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1752231>
- Flamini, R., & Traldi, P. (2010). Grape aroma compounds: terpenes, C13-norisoprenoids, benzene compounds, and 3-alkyl-2-methoxypyrazines. In *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry* (pp. 97–116). John Wiley & Sons, Inc.
- Flanzy, C. (2000). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Mundi-Prensa.
- Franc, C., David, F., & de Revel, G. (2009). Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3318–3327. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.103>

## G

---

- Gao, S., & Xu, J. hua. (2022). Hyperspectral image information fusion-based detection of soluble solids content in red globe grapes. *Computers and Electronics in Agriculture*,

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 196, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.106822>
- Garde-Cerdán, T., da Costa, N. L., Rubio-Bretón, P., Barbosa, R., Baroja, E., Martínez-Vidaurre, J. M., Marín-San Román, S., Sáenz de Urturi, I., & Pérez-Álvarez, E. P. (2021). The most important parameters to differentiate Tempranillo and Tempranillo Blanco grapes and wines through machine learning. *Food Analytical Methods*, *14*(11), 2221–2236. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02049-6>
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2010). Employment of near infrared spectroscopy to determine oak volatile compounds and ethylphenols in aged red wines. *Food Chemistry*, *119*(2), 823–828. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.026>
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2011). Near infrared spectroscopy: easy and rapid tool to determine different volatile compounds in wines. *Current Bioactive Compounds*, *7*(2), 93–105. <https://doi.org/10.2174/157340711796011133>
- Garde-Cerdán, T., Rubio-Bretón, P., Marín-San Román, S., Baroja, E., Sáenz de Urturi, I., & Pérez-Álvarez, E. P. (2021). Study of wine volatile composition of Tempranillo versus Tempranillo Blanco, a new white grape variety. *Beverages*, *7*(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/beverages7040072>
- Gehlken, J., Pour Nikfardjam, M., & Zörb, C. (2022). Determination of aroma compounds in grape mash under conditions of tasting by on-line near-infrared spectroscopy. *European Food Research and Technology*, *248*(9), 2325–2337. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04048-1>
- Gehlken, J., Pour Nikfardjam, M., & Zörb, C. (2023). Prediction of sensory attributes in winemaking grapes by on-line near-infrared spectroscopy based on selected volatile aroma compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *415*(8), 1515–1527. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04549-2>
- Gendrin, C., Roggo, Y., & Collet, C. (2008). Pharmaceutical applications of vibrational

- chemical imaging and chemometrics: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(3), 533–553. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.08.014>
- Genisheva, Z., Quintelas, C., Mesquita, D. P., Ferreira, E. C., Oliveira, J. M., & Amaral, A. L. (2018). New PLS analysis approach to wine volatile compounds characterization by near infrared spectroscopy (NIR). *Food Chemistry*, 246, 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.015>
- Glories, Y., & Augustin, M. (1993). Maturité phénolique du raisin, conséquences technologiques: application aux millésimes 1991 et 1992. In *Compte Rendu Colloque Journée Technique* (pp. 56–61).
- Gomes, V. M., Mendes-Ferreira, A., & Melo-Pinto, P. (2021). Application of hyperspectral imaging and deep learning for robust prediction of sugar and ph levels in wine grape berries. *Sensors*, 21(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/s21103459>
- Gomes, V. M., Reis, M. S., Rovira-Más, F., Mendes-Ferreira, A., & Melo-Pinto, P. (2021). Prediction of sugar content in port wine vintage grapes using machine learning and hyperspectral imaging. *Processes*, 9(7), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pr9071241>
- Gomes, V. M., Rendall, R., Reis, M. S., Mendes-Ferreira, A., & Melo-Pinto, P. (2021). Determination of sugar, ph, and anthocyanin contents in port wine grape berries through hyperspectral imaging: An extensive comparison of linear and non-linear predictive methods. *Applied Sciences*, 11(21), 1–25. <https://doi.org/10.3390/app112110319>
- Gómez-Caballero, A., Goicolea, M. A., Unceta, N., Sampedro, M. C., Sanchez-Ortega, A., Barrio, R. J., & Arbulu, M. (2013). Characterisation of the flavour profile from Graciano *Vitis vinifera* wine variety by a novel dual stir bar sorptive extraction methodology coupled to thermal desorption and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 777, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.024>
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2015).

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Wine aroma compounds in grapes: a critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 202–218. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.650336>
- González-Caballero, V., Sánchez, M. T., López, M. I., & Pérez-Marín, D. (2010). First steps towards the development of a non-destructive technique for the quality control of wine grapes during on-vine ripening and on arrival at the winery. *Journal of Food Engineering*, 101(2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.016>
- González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., & Ferrer, M. (2011). Potencial polifenólico de la uva: Índices propuestos y posibles aplicaciones. *Comunicata Scientiae*, 2(2), 57–69.
- Grandy, J. J., Murtada, K., Belinato, J. R., Ortiz Suárez, P. A., & Pawliszyn, J. (2020). Development and validation of an improved, thin film solid phase microextraction based, standard gas generating vial for the repeatable generation of gaseous standards. *Journal of Chromatography A*, 1632, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461541>
- Gruszecka, D., Grandy, J. J., Gionfriddo, E., Singh, V., & Pawliszyn, J. (2021). Direct immersion thin film solid phase microextraction of polychlorinated n-alkanes in cod liver oil. *Food Chemistry*, 353, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129244>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Martínez-Lapuente, L., Souza-da Costa, B., Rubio-Bretón, P., & Pérez-Álvarez, E. P. (2020). Phenolic composition of Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) grapes and wines after biostimulation via a foliar seaweed application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 825–835. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10094>
- Gutiérrez-Salcedo, S. (2019). *Artificial intelligence in digital agriculture. Towards in-field grapevine monitoring using non-invasive sensors* [Universidad de La Rioja]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=231534>
- Gutiérrez-Salcedo, S., Tardáguila, J., Fernández-Novales, J., & Diago, M. P. (2019). On-the-go hyperspectral imaging for the in-field estimation of grape berry soluble



solids and anthocyanin concentration. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25, 127–133. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12376>

### H

---

Hagen, N., & Kudenov, M. W. (2013). Review of snapshot spectral imaging technologies. *Optical Engineering*, 52(9), 1–23. <https://doi.org/10.1117/1.oe.52.9.090901>

Hair, J. F., Anderson, R. E., Black, W. C., & Babin, B. J. (2010). *Multivariate data analysis* (7th ed.). John Wiley & Sons.

Herschel, W. (1800). Investigation of the powers of the prismatic colours to heat and illuminate objects; with remarks, that prove the different refrangibility of radiant heat. To which is added, an inquiry into the method of viewing the sun advantageously, with telescopes of. In *Philosophical Transactions of the Royal Society* (Vol. 90, p. 284).

Hjelmeland, A. K., Wylie, P. L., & Ebeler, S. E. (2016). A comparison of sorptive extraction techniques coupled to a new quantitative, sensitive, high throughput GC-MS/MS method for methoxypyrazine analysis in wine. *Talanta*, 148, 336–345. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.086>

Huang, Y., Liew, C. S. M., Goh, S. X. L., Goh, R. M. V., Ee, K. H., Pua, A., Liu, S. Q., Lassabliere, B., & Yu, B. (2020). Enhanced extraction using a combination of stir bar sorptive extraction and thin film-solid phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1633, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461617>

### J

---

James, A. T., & Martin, A. J. P. (1951). Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem J*, 50, 679–690. <https://doi.org/10.1042/bj0520238>

James, G., Witten, D., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2013). *An introduction to statistical learning with applications in R* (1st ed. 20). Springer New York.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

<https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7138-7>

Jones, G. V., Edwards, E. J., Bonada, M., Sadras, V. O., Krstic, M. P., & Herderich, M. J. (2021). Climate change and its consequences for viticulture. In *Managing Wine Quality: Volume One: Viticulture and Wine Quality* (2nd ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102067-8.00015-4>

## K

---

Kaiser, H. F. (1958). The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika*, 23(3), 187–200. <https://doi.org/10.1007/BF02289233>

Kalopesa, E., Karyotis, K., Tziolas, N., Tsakiridis, N., Samarinas, N., & Zalidis, G. (2023). Estimation of sugar content in wine grapes via In Situ VNIR–SWIR point spectroscopy using explainable artificial intelligence techniques. *Sensors*, 23(3), 1–24. <https://doi.org/10.3390/s23031065>

Kataoka, H., Lord, H. L., & Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1–2), 35–62. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00309-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00309-5)

Kawano, S. (2002). Sample presentations for near infrared analysis of intact fruits , single grains , vegetable juice , milk and other agricultural products. In *NIR Analysis of Fruit and Agricultural Products* (Vol. 1, pp. 15–18). IM Publications Open LLP.

Kfoury, N. C., Stuff, J. R., & Whitecavage, J. A. (2021). Identification of off-odor compounds in paper products using Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME) and GC-MS/O. In *GERSTEL Application Note 218*.

Kfoury, N. C., Whitecavage, J. A., & Stuff, J. R. (2021). Comparison of three types of Thin Film-Solid Phase Microextraction phases for beverage extractions. *GERSTEL Application Note*, 219(219), 1–10.

Kizildeniz, T., Pascual, I., Hilbert, G., Irigoyen, J. J., & Morales, F. (2022). Is Tempranillo Blanco grapevine different from Tempranillo Tinto only in the color of the grapes?

An updated review. *Plants*, 11(13), 1–14. <https://doi.org/10.3390/plants11131662>

### L

---

Lanças, F. M., Queiroz, M. E. C., Grossi, P., & Olivares, I. R. B. (2009). Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *Journal of Separation Science*, 32(5–6), 813–824. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800669>

Larraín, M., Guesalaga, A. R., & Agosin, E. (2008). A multipurpose portable instrument for determining ripeness in wine grapes using NIR spectroscopy. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 57(2), 294–302. <https://doi.org/10.1109/TIM.2007.910098>

Laura-Ochoa, L. M. (2019). Evaluación de algoritmos de clasificación utilizando validación cruzada. *Laccei International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology*, 1–6. <http://dx.doi.org/10.18687/LACCEI2019.1.1.471>

Li, J. L., Sun, D.-W., & Cheng, J. H. (2016). Recent advances in nondestructive analytical techniques for determining the total soluble solids in fruits: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 897–911. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12217>

Li, Z., Yu, B., Cong, H., Yuan, H., & Peng, Q. (2017). Recent development and application of Solid Phase Extraction materials. *Reviews on Advanced Materials Science*, 48, 87–111.

Lorenzo, C., Garde-Cerdán, T., Pedroza, M. A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2009). Determination of fermentative volatile compounds in aged red wines by near infrared spectroscopy. *Food Research International*, 42(9), 1281–1286. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.021>

### M

---

Marín-San Román, S., Carot-Sierra, J. M., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2022). Optimization of thin film-microextraction

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds. *Analytica Chimica Acta*, 1226, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340254>
- Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., & Garde-Cerdán, T. (2020). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*, 137, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>
- Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2005). Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *Journal of Chromatography A*, 1098(1–2), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.126>
- Marrufo-Curtido, A., Cejudo-Bastante, M. J., Durán-Guerrero, E., Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., Chinnici, F., & García-Barroso, C. (2012). Characterization and differentiation of high quality vinegars by stir bar sorptive extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SBSE-GC-MS). *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.028>
- Marsili, R. T., & Laskonis, C. R. (2019). Evaluation of sequential-SBSE and TF-SPME extraction techniques prior to GC-TOFMS for the analysis of flavor volatiles in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(2), 113–118. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1590070>
- Marten, G. C., Shenk, J. S., & Barton, F. E. (1989). Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): analysis of forage quality. *USDA Agriculture Handbook*, 643, 1–114.
- Martínez-Gil, A. M., Garde-Cerdán, T., Martínez, L., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2011). Effect of oak extract application to Verdejo grapevines on grape and wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3253–3263. <https://doi.org/10.1021/jf104178c>
- Martínez de Toda, F. (2007). *Claves de la viticultura de calidad*. Mundi-Prensa.
- Martínez, J., Rubio-Bretón, P., Vicente, M. E., & García-Escudero, E. (2018). Influencia



- del terroir en el perfil aromático de Tempranillo Blanco en la D.O.Ca. Rioja. *EDP Sciences*, 50, 1–7. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20185002003>
- Martins, R. C., Barroso, T. G., Jorge, P., Cunha, M., & Santos, F. (2022). Unscrambling spectral interference and matrix effects in *Vitis vinifera* Vis-NIR spectroscopy: towards analytical grade ‘in vivo’ sugars and acids quantification. *Computers and Electronics in Agriculture*, 194, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2022.106710>
- Massart, D. L., Vandeginste, E. G. M., Deming, S. N., Michotte, Y., Kaufman, L., & Bertsch, W. (1988). *Chemometrics : A Textbook* (Vol. 12).
- McClure, W. F. (2003). 204 Years of near infrared technology: 1800-2003. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 11(6), 487–518. <https://doi.org/10.1255/jnirs.399>
- Mendez-Costabel, M. P., Wilkinson, K. L., Bastian, S. E. P., Jordans, C., McCarthy, M. G., Ford, C. M., & Dokoozlian, N. K. (2014). Effect of increased irrigation and additional nitrogen fertilisation on the concentration of green aroma compounds in *Vitis vinifera* L. Merlot fruit and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(1), 80–90. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12062>
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Moreno-Vigara, J. J., & Peinado-Amores, R. A. (2010). *Química Enológica*. Mundi-Prensa.
- Murtada, K., Galpin, V., Grandy, J. J., Singh, V., Sanchez, F., & Pawliszyn, J. (2021). Development of porous carbon/polydimethylsiloxane thin-film solid-phase microextraction membranes to facilitate on-site sampling of volatile organic compounds. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100435>

## N

---

- Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., Rodríguez-Pulido, F. J., & Heredia, F. J.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- (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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.030>
- Nogueira, J. M. F. (2012). Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: a review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 757, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.033>
- Nogueira, J. M. F. (2015). Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 71, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.002>
- Norris, K., & Williams, P. C. (1984). Optimization of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hard red spring wheat. I. Influence of particle size. In *Cereal Chemistry* (Vol. 61, Issue 2, pp. 158–164).

## O

---

- Ochiai, N. (2018). The twister sisters pick up the flavors. *GERSTEL Solutions Worldwide*, 15, 9–12.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., David, F., & Sandra, P. (2018). Recent developments of stir bar sorptive extraction for food applications: Extension to polar solutes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), 7249–7255. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02182>
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Ieda, T., David, F., & Sandra, P. (2013). Multi-stir bar sorptive extraction for analysis of odor compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1315, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.070>
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., & Pfannkoch, E. (2008). Sequential stir bar sorptive extraction for uniform enrichment of trace amounts of organic pollutants in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1200(1), 72–79.

<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.069>

Olcer, Y. A., Tascon, M., Eroglu, A. E., & Boyaci, E. (2019). Thin film microextraction: Towards faster and more sensitive microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 113, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.022>

Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. T. (1993). *Practical NIR spectroscopy : with applications in food and beverage analysis* (Longman Sc).

## P

---

Pardo-García, A. I., Serrano De La Hoz, K., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines. *Food Chemistry*, 163, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.100>

Pasquini, C. (2018). Near infrared spectroscopy: a mature analytical technique with new perspectives – A review. *Analytica Chimica Acta*, 1026, 8–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.004>

Pedroza, M. A., Zalacain, A., Lara, J. F., & Salinas, M. R. (2010). Global grape aroma potential and its individual analysis by SBSE-GC-MS. *Food Research International*, 43(4), 1003–1008. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.008>

Perestrelo, R., Barros, A. S., Rocha, S. M., & Câmara, J. S. (2011). Optimisation of solid-phase microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry based methodology to establish the global volatile signature in pulp and skin of *Vitis vinifera* L. grape varieties. *Talanta*, 85(3), 1483–1493. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.025>

Pérez-Juan, P. M., & Morales-Ordóñez, J. (1998). *Manual básico de laboratorio de bodega*.

Pérez-Marín, D. (2005). *Tecnología NIRS para la certificación y trazabilidad de piensos compuestos*. Universidad de Córdoba.

Piri-Moghadam, H., Gionfriddo, E., Grandy, J. J., Alam, M. N., & Pawliszyn, J. (2018).

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Development and validation of eco-friendly strategies based on thin film microextraction for water analysis. *Journal of Chromatography A*, 1579, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.10.026>
- Piri-Moghadam, H., Gionfriddo, E., Rodriguez-Lafuente, A., Grandy, J. J., Lord, H. L., Obal, T., & Pawliszyn, J. (2017). Inter-laboratory validation of a thin film microextraction technique for determination of pesticides in surface water samples. *Analytica Chimica Acta*, 964, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.014>
- Prieto, A., Basauri, O., Rodil, R., Usobiaga, A., Fernández, L. A., Etxebarria, N., & Zuloaga, O. (2010). Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2642–2666. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.12.051>
- ## R
- 
- Ramírez-Pérez, M. P., & González-Caballero, V. (2012). *Control del proceso de maduración del viñedo en climas mediterráneos* (Junta de A).
- RDGIA, de 5 de noviembre, 276 Boletín oficial del estado 142192 (2021).
- Ren, Y., Huang, X., Aheto, J. H., Wang, C., Ernest, B., Tian, X. Y., He, P., Chang, X., & Wang, C. (2021). Application of volatile and spectral profiling together with multimode data fusion strategy for the discrimination of preserved eggs. *Food Chemistry*, 343, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128515>
- Reynier, A. (2001). *Manual de Viticultura*. Mundi-Prensa.
- Reynolds, A. G. (2021). Viticultural and vineyard management practices and their effects on grape and wine quality. In *Managing Wine Quality: Volume One: Viticulture and Wine Quality* (2nd ed., pp. 443–539). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102067-8.00012-9>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de enología. 1. Microbiología del vino. Vinificaciones* (1a edición). Hemisferio Sur.



- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2003). *Tratado de enología. 2. Química del vino. Estabilización y tratamientos* (Vol. 2). Hemisferio Sur.
- Riccioli, C. (2011). *Detección y cuantificación de la especie en harinas proteicas de origen animal mediante el uso de sensores hiperespectrales* [Universidad de Córdoba]. <http://helvia.uco.es/xmlui/handle/10396/7036>
- Rinnan, Å., Berg, F. van den, & Engelsen, S. B. (2009). Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(10), 1201–1222. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>
- Ripoll, G., Vazquez, M., & Vilanova de la Torre, M. (2017). Ultraviolet - visible - near infrared spectroscopy for rapid determination of volatile compounds in white grapes during ripening. *Ciencia e Tecnica Vitivinicola*, 32(1), 53–61. <https://doi.org/10.1051/ctv/20173201053>
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2014a). Origins of grape and wine aroma. Part 2. Chemical and sensory analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(1), 25–42. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13106>
- Robinson, A. L., Boss, P. K., Solomon, P. S., Trengove, R. D., Heymann, H., & Ebeler, S. E. (2014b). Origins of grape and wine flavor. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1, 1–24. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.12070>
- Rodríguez-Pulido, F. J., Mora-Garrido, A. B., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2022). Research progress in imaging technology for assessing quality in wine grapes and seeds. *Foods*, 11(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods11030254>
- Rolle, L., Río Segade, S., Paissoni, M. A., Giacosa, S., & Gerbi, V. (2021). Assessment and control of grape maturity and quality. In *White Wine Technology* (pp. 1–16). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823497-6.00001-6>
- Romero-Gamero, M. Á. (2001). *Desarrollo de nuevas metodologías analíticas en el control de*

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

*calidad de la industria farmacéutica.*

Rubio-Bretón, P., Salinas, M. R., Nevares, I., Pérez-Álvarez, E. P., Del Álamo-Sanza, M., Marín-San Román, S., Alonso, G. L., & Garde-Cerdán, T. (2019). Recent advances in the study of grape and wine volatile composition: varietal, fermentative, and aging aroma compounds. In M. Bordiga & L. M. L. Nollet (Eds.), *Food Aroma Evolution During Food Processing, Cooking, and Aging* (1st editio, pp. 439–463). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780429441837-22>

## S

---

Saint-Cricq, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Rev Fr Oenol*, 173, 22–25.

Salinas, M. R., Zalacain, A., Pardo, F., & Alonso, G. L. (2004). Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during *Vitis vinifera* ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4821–4827. <https://doi.org/10.1021/jf040040c>

Sampedro, M. C., Goicolea, M. A., Unceta, N., Sánchez-Ortega, A., & Barrio, R. J. (2009). Sequential stir bar extraction, thermal desorption and retention time locked GC-MS for determination of pesticides in water. *Journal of Separation Science*, 32(20), 3449–3456. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900383>

Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10861–10872. <https://doi.org/10.1021/jf503929v>

Sánchez-Palomo, E., Alañón, M. E., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A., & Pérez-Coello, M. S. (2009). Comparison of extraction methods for volatile compounds of Muscat grape juice. *Talanta*, 79(3), 871–876. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.05.019>

Savitzky, A., & Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified

- least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8), 1627–1639. <https://doi.org/10.1021/ac60214a048>
- Scherer, N., Marcseková, K., Posset, T., & Winter, G. (2019). New studies on leachables in commercial scale protein drug filling lines using stir bar sorptive extraction coupled with TD-GC–MS and UPLC/QTOF-MS/MS analytics. *International Journal of Pharmaceutics*, 555, 404–419. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.033>
- Segura-Borrego, M. P., Ríos-Reina, R., Ubeda, C., Callejón, R. M., & Lourdes Morales, M. (2020). Comparison of the novel thin film-solid phase microextraction and sorptive extraction methods for Picual and Hojiblanca olive oil volatile fraction analysis in headspace. *Foods*, 9(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods9060748>
- Serrano de la Hoz, K. (2014). *Determinación de precursores aromáticos glicosídicos de uvas, mostos y vinos, blancos y tintos. Aplicación en bodega*. Universidad de Castilla-La Mancha.
- Serrano de la Hoz, K., Salinas, M. R., & Ferrandino, A. (2016). Different coatings for the HS-SBSE grape volatile analysis in model solution: Preliminary results. *Food Chemistry*, 212, 814–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.047>
- Shaw, R. A., & Mantsch, H. H. (2016). Near-IR spectrometers. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed., pp. 50–58). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00220-X>
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Routine operation, calibration, development and network system management manual*. (Vol. 3). NIRSystems Inc., Silver Spring.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1996). Calibration the ISI way. In A. M. C. Davies & P. C. Williams (Eds.), *Near infrared spectroscopy : the future waves* (NIR Public, pp. 198–202).
- Siesler, H. W. (2016). Interpretation of Near-Infrared Spectra. In *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (3rd ed., pp. 30–39). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12173-0>

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Silva, R., & Melo-Pinto, P. (2021). A review of different dimensionality reduction methods for the prediction of sugar content from hyperspectral images of wine grape berries. *Applied Soft Computing*, 113, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.asoc.2021.107889>
- Smyth, H. E., Cozzolino, D., Cynkar, W., Damberg, R. G., Sefton, M. A., & Gishen, M. (2008). Near infrared spectroscopy as a rapid tool to measure volatile aroma compounds in Riesling wine: Possibilities and limits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(7), 1911–1916. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1940-0>
- Stuff, J. R., Whitecavage, J. A., Grandy, J. J., & Pawliszyn, J. (2018). Analysis of beverage samples using Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME) and thermal desorption GC/MS. *GERSTEL Application Note*, 200, 1–10.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(9), 1145–1159. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1018-4>
- Summerson, V., Viejo, C. G., Torrico, D. D., Pang, A., & Fuentes, S. (2020). Detection of smoke-derived compounds from bushfires in Cabernet-Sauvignon grapes, must, and wine using Near-Infrared spectroscopy and machine learning algorithms. *Oeno One*, 54(4), 1105–1119. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2020.54.4.4501>

## T

---

- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Jianbo, X., Mahunu, G. K., Jiyong, S., Xu, J. L., & Sun, D.-W. (2019). Recent progress in rapid analyses of vitamins, phenolic, and volatile compounds in foods using vibrational spectroscopy combined with chemometrics: a review. *Food Analytical Methods*, 12(10), 2361–2382. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01573-w>
- Tian, X. Y., Aheto, J. H., Huang, X., Zheng, K., Dai, C., Wang, C., & Bai, J. W. (2021). An evaluation of biochemical, structural and volatile changes of dry-cured pork using a combined ion mobility spectrometry, hyperspectral and confocal imaging



approach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14), 5972–5983.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.11251>

Togores, J. H. (2006). *La calidad del vino desde el viñedo*. Mundi-Prensa.

## U

---

Ubeda, C., Callejón, R. M., Troncoso, A. M., Peña-Neira, Á., & Morales, M. L. (2016). Volatile profile characterisation of Chilean sparkling wines produced by traditional and Charmat methods via sequential stir bar sorptive extraction. *Food Chemistry*, 207, 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.117>

Urraca, R., Sanz-Garcia, A., Tardáguila, J., & Diago, M. P. (2016). Estimation of total soluble solids in grape berries using a hand-held NIR spectrometer under field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 3007–3016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7470>

Usseglio-Tomasset, L. (1998). *Química enológica*. Mundi-Prensa.  
<https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

## V

---

Vasile-Simone, G., Castro-Mejías, R., Natera-Marín, R., Masino, F., Barroso, C. G., & Durán-Guerrero, E. (2017). Application of a stir bar sorptive extraction method for the determination of volatile compounds in different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 939–948. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7818>

Vernarelli, L., Whitecavage, J. A., & Stuff, J. R. (2019). Analysis of food samples using Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME) and thermal desorption GC/MS. *GERSTEL Application Note*, 202, 1–8.

Vyviurska, O., Thai, H. A., Garančovská, D., Gomes, A. A., & Špánik, I. (2022). Enhanced multi-stir bar sorptive extraction for wine analysis: Alteration in headspace mode. *Food Research International*, 158, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111510>

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

### W

---

- Wang, D., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Yu, D. (2022). Advanced detection techniques using artificial intelligence in processing of berries. *Food Engineering Reviews*, 14(1), 176–199. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09298-5>
- Wang, L., Sun, D.-W., Pu, H., & Cheng, J. H. (2017). Quality analysis, classification, and authentication of liquid foods by near-infrared spectroscopy: A review of recent research developments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(7), 1524–1538. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1115954>
- Wang, X. (2019). Near-infrared spectroscopy for food quality evaluation. In *Evaluation Technologies for Food Quality* (pp. 105–118). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814217-2.00007-X>
- Williams, P. C., & Norris, K. (2001). Variables affecting Near-infrared spectroscopic. In *Near-infrared technology in the agricultural and food industries* (2nd ed., pp. 171–185). American Association of Cereal Chemists.
- Wu, D., & Sun, D.-W. (2013). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: a review - part I: fundamentals. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.014>

### X

---

- Xu, M., Sun, J., Yao, K., Cai, Q., Shen, J., Tian, Y., & Zhou, X. (2022). Developing deep learning based regression approaches for prediction of firmness and pH in Kyoho grape using Vis/NIR hyperspectral imaging. *Infrared Physics and Technology*, 120, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2021.104003>
- Xu, M., Sun, J., Yao, K., Wu, X., Shen, J., Cao, Y., & Zhou, X. (2022). Nondestructive detection of total soluble solids in grapes using VMD-RC and hyperspectral imaging. *Journal of Food Science*, 87(1), 326–338. <https://doi.org/10.1111/1750->

3841.16004

### Y

---

Ye, W., Xu, W., Yan, T., Yan, J., Gao, P., & Zhang, C. (2023). Application of Near-Infrared spectroscopy and hyperspectral imaging combined with machine learning algorithms for quality inspection of grape: a Review. *Foods*, 12(1), 1–23. <https://doi.org/10.3390/foods12010132>

### Z

---

Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71(4), 1610–1615. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.051>

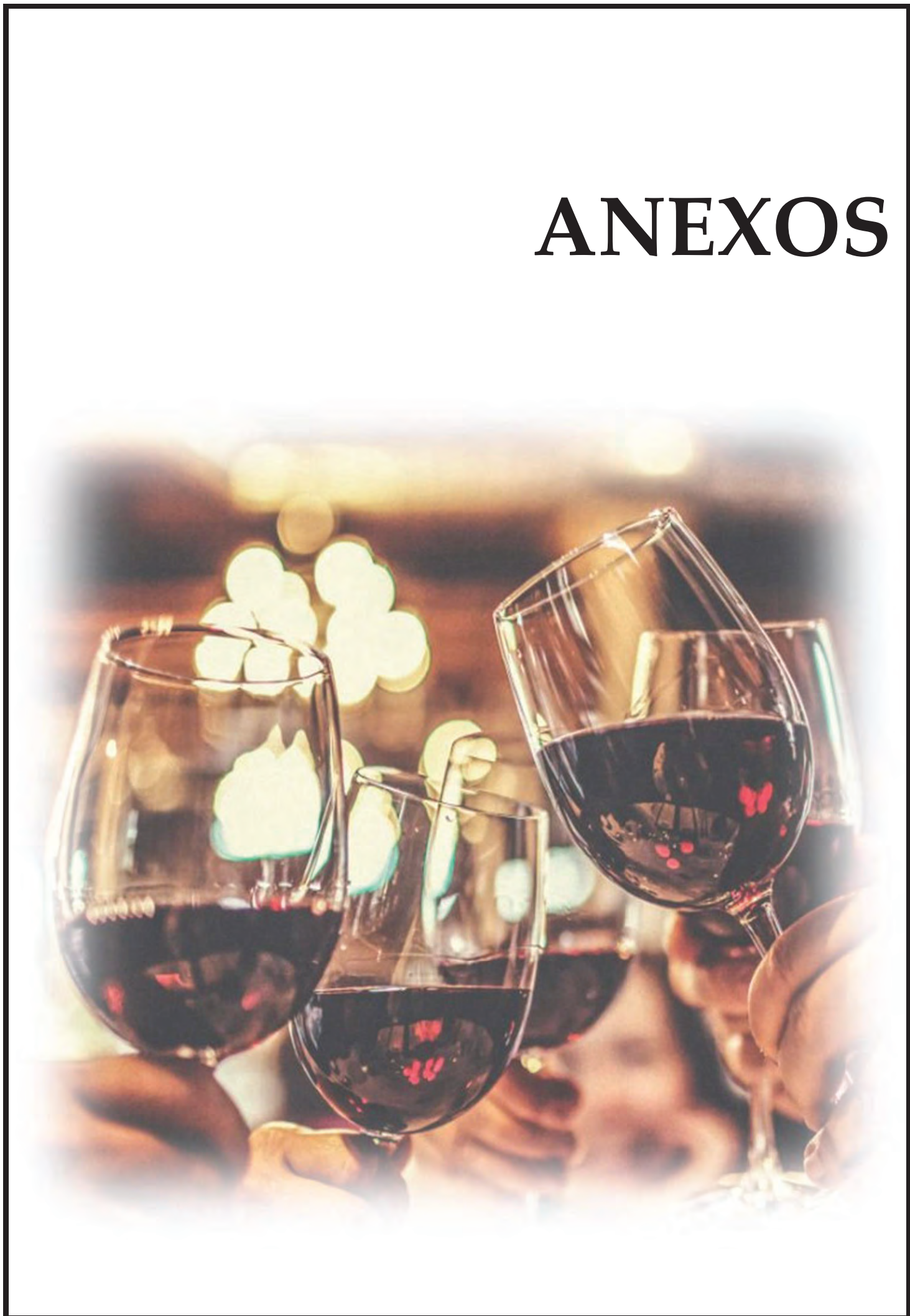
Zamora, E. (2013). *Control no destructivo e in situ de productos y procesos en la industria del cerdo ibérico usando sensores espectrales en el infrarrojo cercano*. 1–505.

Zoecklein, B. W., & Gump, B. H. (2021). Practical methods of evaluating grape quality and quality potential. In *Managing Wine Quality: Volume One: Viticulture and Wine Quality* (2nd ed., Issue 2). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102067-8.00003-8>





# ANEXOS





**ANEXO I: Artículo de revisión sobre los avances en las técnicas analíticas para la extracción de compuestos volátiles de la uva y del vino**

**Título:** Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds

**Publicado en:** Food Research International 137 (2020) 109712

**Autores:** Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., y Garde-Cerdán, T.

**Resumen**

En este trabajo de revisión se realiza un resumen sobre las técnicas tradicionales más utilizadas para la extracción de compuestos volátiles en uva y en vino, así como técnicas más actuales y novedosas. Las técnicas presentadas son: la extracción líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*), la extracción en fase sólida (SPE, *Solid Phase Extraction*), la microextracción en fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*), la extracción mediante barrita agitadora absorbente (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) y la microextracción en fase sólida mediante tira de malla de carbono o película fina (TF-SPME, *Thin Film-Solid Phase Microextraction*).

Para cada una de ellas se realizó una descripción, numerándose las principales características, así como las ventajas e inconvenientes frente a las otras técnicas, justificando, de este modo, el nacimiento de las técnicas más novedosas como una mejora de las técnicas clásicas.

Este artículo de revisión se escribió tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica, lo que sirvió para escoger las técnicas a optimizar en la presente tesis doctoral.







Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)

Review

## Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds

Sandra Marín-San Román<sup>a</sup>, Pilar Rubio-Bretón<sup>a</sup>, Eva P. Pérez-Álvarez<sup>a,b</sup>,  
Teresa Garde-Cerdán<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Grupo VIENAP, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja), Ctra. de Burgos, Km. 6., 26007 Logroño, Spain

<sup>b</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Campus Universitario de Espinardo, Ed. 25, 30100 Murcia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Analytical techniques  
Volatile compounds  
Grape  
Wine  
Extraction  
SBSE  
TF-SPME  
Aroma

### ABSTRACT

The grape and wine aroma is one of the most determining factors of quality, therefore the study of their volatile composition is a very important topic in vitiviniculture. The range of concentrations in which many of these compounds are found is quite low, in concentrations of ng/L; due to this, a sample preparation stage is necessary before doing the chromatographic analysis of the volatile compounds. In this review, the main analytical techniques used for the extraction of volatile compounds in grapes and wines are studied. The techniques presented are liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE), and thin film solid phase microextraction (TF-SPME). For each of these techniques, a description was made, and the different characteristics were numbered, as well as their main advantages and disadvantages. Furthermore, from the second technique, a comparison is made with the previous techniques, explaining the reasons why new techniques have emerged. Throughout the review it is possible to see the different techniques that have been emerging in the past years as an improvement of the classical techniques.

### 1. Introduction

Grape aroma is important to determine wine quality, and thus to characterize wine value (Aleixandre-Tudo, Weightman, Panzeri, Nieuwoudt, & Du Toit, 2015; Gambetta, Bastian, Cozzolino, & Jeffery, 2014; Mihnea, González-SanJosé, Ortega-Heras, & Pérez-Magariño, 2015). Grape and wine aroma is very complex due to its origin and the large number of volatile compounds it contains. The study of the volatile fraction in grape and wine is very important, since these compounds determine, to a large extent, the acceptance or rejection by the consumer (Castro-Mejías, Natera-Marín, Durán-Guerrero, & García-Barroso, 2008). More than 800 volatile compounds have been found in wine with a wide range of concentrations ranging from a few ng/L to more than hundreds of mg/L (De Castilhos, Del Bianchi, Gómez-Alonso, García-Romero, & Hermosín, 2019). In order to accomplish the identification and quantification of grape and wine volatile compounds, a previous stage of sample preparation before chromatographic analysis is necessary (Castro-Mejías et al., 2008; Perestrelo, Barros, Rocha, & Cámara, 2011; Sánchez-Palomo, Alaón, Díaz-Maroto, González-Viñas, & Pérez-Coello, 2009).

The analytical method consists of several stages such as sampling, sample preparation, separation, detection, and data analysis. Sampling and sample preparation (extraction, preconcentration, fractionation and isolation) are the steps that normally require the most time during the analytical procedure (Kataoka, Lord, & Pawliszyn, 2000; Maslamani, Manandhar, Geremia, & Logue, 2016). Sample preparation is a critical step, since a large amount of analyte can be lost and lead to significant errors (Andrade-Eiroa, Canle, Leroy-Cancellieri, & Cerdà, 2016a; Rodríguez-Bernaldo de Quirós, González-Castro, López-Hernández, & Simal-Lozano, 1996). Therefore, it is not an exaggeration to say that a good choice of the sample preparation procedure influences the analysis reliability and precision. Sample preparation techniques have evolved. The highest accuracy, precision and sensitivity are sought and also minimize the costs and the solvents used (Serrano de la Hoz, 2014).

Sample preparation prior to detection is necessary due to:

- Analytes are found in complex matrices that complicate their detection.
- There are a variety of chemical families: acids, alcohols, esters, ketones ... it is necessary to determine what the target compounds are.

\* Corresponding author.

E-mail address: [teresa.garde@ievv.es](mailto:teresa.garde@ievv.es) (T. Garde-Cerdán).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>

Received 14 April 2020; Received in revised form 10 September 2020; Accepted 14 September 2020

Available online 21 September 2020

0963-9969/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## ANEXO II: Corrección de la Tabla 6 del Artículo 1

Durante la escritura de la presente tesis doctoral, se pudo comprobar que la Tabla 6 del Artículo 1: Optimization of stir bar sorptive extraction (SBSE) and multi-stir bar sorptive extraction (mSBSE) to improve must volatile compounds extraction, era incorrecta, por lo que se adjunta la Tabla 6 corregida (Tabla 8.1).

**Tabla 8.1.** Corrección de la Tabla 6 del Artículo 1. Valores del área relativa con respecto al 2-octanol (P.I.) obtenidos con las condiciones globales de los dos métodos (SBSE y <sup>m</sup>SBSE) para cada uno de los compuestos.

	SBSE	<sup>m</sup> SBSE	p
Terpenoides			
Linalool	<b>0,69 ± 0,01</b>	0,13 ± 0,00	<b>0,00*</b>
α-Terpineol	<b>0,15 ± 0,01</b>	0,07 ± 0,01	<b>0,00*</b>
Geraniol	<b>0,17 ± 0,02</b>	0,11 ± 0,01	<b>0,01*</b>
C <sub>13</sub> norisoprenoides			
β-Damascenona	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,37
β-Ionona	0,22 ± 0,00	<b>0,69 ± 0,08</b>	<b>0,00*</b>
Bencenoides			
Benzaldehído	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,72
2-Feniletanol	<b>0,05 ± 0,01</b>	0,02 ± 0,00	<b>0,02*</b>
Ésteres			
Acetato de isoamilo	<b>2,32 ± 0,24</b>	0,07 ± 0,01	<b>0,00*</b>
Hexanoato de etilo	<b>0,72 ± 0,05</b>	0,04 ± 0,01	<b>0,00*</b>
Octanoato de etilo	<b>0,32 ± 0,01</b>	0,09 ± 0,01	<b>0,00*</b>
Decanoato de etilo	0,07 ± 0,01	<b>0,12 ± 0,00</b>	<b>0,00*</b>
Ácidos grasos			
Ácido octanoico	<b>0,15 ± 0,04</b>	0,07 ± 0,01	<b>0,03*</b>
Ácido hexanoico	<b>0,23 ± 0,03</b>	0,11 ± 0,04	<b>0,01*</b>
Alcoholes superiores			
Alcohol de isoamilo	<b>0,10 ± 0,01</b>	0,00 ± 0,00	<b>0,00*</b>
Alcohol amílico	<b>0,07 ± 0,01</b>	0,00 ± 0,00	<b>0,00*</b>
Compuestos C <sub>6</sub>			
(Z)-3-hexen-1-ol	<b>0,09 ± 0,01</b>	0,01 ± 0,00	<b>0,00*</b>
Hexanal	<b>1,79 ± 0,16</b>	0,23 ± 0,17	<b>0,00*</b>
1-Hexanol	<b>1,71 ± 0,56</b>	0,08 ± 0,00	<b>0,01*</b>
(E)-2-Hexenal	<b>0,10 ± 0,04</b>	0,03 ± 0,01	<b>0,04*</b>
(E)-2-Hexen-1-ol	<b>0,30 ± 0,05</b>	0,02 ± 0,00	<b>0,00*</b>
2-Etil-1-hexanol	<b>0,04 ± 0,01</b>	0,02 ± 0,00	<b>0,02*</b>
Otros compuestos			
Decanal	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,69
Furanmetanol	0,05 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,08
Acetol	0,27 ± 0,14	0,05 ± 0,02	0,07
Jasmonato de metilo	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,08	0,38
Heptanal	<b>0,03 ± 0,00</b>	0,02 ± 0,02	<b>0,00*</b>

Los datos se muestran como media ± desviación estándar (n = 3).

\*Indican diferencias significativas entre métodos (p ≤ 0,05). La negrita indica el valor más alto del compuesto que muestra diferencias significativas.

