

# VI CONGRESO IBÉRICO de AgrolIngeniería

5 a 7 de Septiembre | 2011  
Universidade de Évora | Portugal



## Determinación del contenido en polifenoles en uva de mesa mediante tecnología NIRS

C. Jarén<sup>1</sup>, A.C. Agulheiro-Santos<sup>2</sup>, V. Palma<sup>2</sup>, A. Rato<sup>2</sup>, N. Arias<sup>1</sup> y  
S. Arazuri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Pública de Navarra. ETSIA. Dpto de Proyectos e Ingeniería Rural. Campus Arrosadía. 31006 Pamplona-Spain.  
cjaren@unavarra.es

<sup>2</sup> Universidade de Évora. Departamento de Fitotecnia. Pólo da Mitra. Apartado 94. 7002-554 Évora, Portugal.  
acsantos@uevora.pt

### Resumen

Los compuestos fenólicos de la uva morada provienen de su piel. Los polifenoles son importantes para la fisiología de las uvas pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas. Los polifenoles están muy relacionados con las propiedades organolépticas de la uva de mesa. En general, las técnicas utilizadas para determinar estos compuestos suelen ser destructivas y suelen utilizarse el refractómetro y la colorimetría o el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La espectroscopía NIR permite determinar estos compuestos de forma no destructiva. En este trabajo, se utiliza el NIRS para medir el contenido polifenoles de uva de mesa de la variedad ‘Crimson’ producidas en ‘Herdade Vale da Rosa’ de la zona de Ferreira do Alentejo, Sur de Portugal, recolectadas la campaña de septiembre de 2010 utilizado como método de referencia la HPLC. Además se determinó su contenido en grados Brix, el color y el peso de la piel y la pulpa. Los datos han sido analizados con el programa Unscrambrel con el objetivo de encontrar un modelo que nos permita predecir el contenido en polifenoles, grados Brix y color (L,a,b). Los distintos modelos obtenidos, nos han permitido predecir con unos coeficientes de correlación  $r$  que van desde el 0.76 para la variable L del color de las uvas hasta el 0.96 para los grados Brix.

### Abstract

Phenolic compounds of red grape come from its skin. Polyphenols are important for the physiology of grapes since they contribute to the resistance of insects and microorganisms and help to preserve grapes integrity due to their continue exposure to environment stresses including ultraviolet radiation and relatively high temperatures. Polyphenols are much related to the organoleptic properties of table grapes. In general, the techniques used to determine these compounds are usually destructive being the more commonly used the refractometer and colorimetry or the use of high performance liquid chromatography (HPLC). Near infrared (NIR) spectroscopy is a non-destructive method able to determine polyphenolic compounds. In this research, NIR spectroscopy was used to measure the polyphenol content in table grape of ‘Crimson’ variety produced in ‘Herdade Vale da Rosa’ from the Ferreira do Alentejo area located at the south of Portugal. These table grapes were harvested in September 2010 using HPLC as a reference method. In addition, their Brix content, colour and pulp and skin weight was determined. The data obtained was analysed with Unscrambled software in order to find a model capable of predicting the content of polyphenols, Brix, colour and skin. The different models obtained have allowed us predicting with a  $r$  value between 0.76 and 0.96.

**Palabras Clave:** Color, °Brix, HPLC, Espectrofotometría, SIMCA.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Los compuestos fenólicos de la uva incluyen, entre otros, a los ácidos fenólicos y flavonoides los cuales son sintetizados por una vía metabólica común a partir de la fenilalanina. Todos provienen de las uvas moradas, particularmente de su piel. Los polifenoles son importantes para la fisiología de las uvas pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas. Los polifenoles están muy relacionados con las propiedades organolépticas de la uva de mesa y las antocianinas son las responsables directas del color. Los flavanoles son particularmente relevantes para la astringencia y pueden tener alguna influencia en el amargor. Por otra parte, los flavonoides, los ácidos fenólicos y los flavonoides influyen en el color vino y asegurar su estabilidad durante el envejecimiento.

En general, las técnicas utilizadas para determinar estos compuestos suelen ser destructivas y suelen utilizarse el refractómetro y la colorimetría o el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia (High-performance liquid chromatography: HPLC). La espectroscopía NIR permite determinar estos compuestos de forma no destructiva. En el caso de la uva de vinificación, la espectroscopía NIR se ha utilizado como método no destructivo en la valoración del contenido en sólidos solubles, acidez e incluso propiedades cualitativas como la variedad o el origen (Jarén et al., 2001 y Arana et al., 2007), observándose una estrecha relación entre el contenido en sólidos solubles y la medición NIR en el rango de 800 a 2500 nm. En el primer trabajo citado se obtuvieron coeficientes de determinación múltiple en calibración ( $R^2$ ) entre 0.89 y 0.925, dependiendo de las variedades. Esta tecnología también ha sido utilizado para medir, ácido glucónico, el glicerol, los sólidos solubles y el pH del jugo de uva y para determinar taninos condensados, antocianinas y la materia seca en homogeneizados bayas de uva roja (citador por Ferrer et al., 2010).

En cuanto a la determinar los compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos en los alimentos, el NIRS también ha dado buenos resultados (McGoverin et al., 2010). Por otra parte, algunos estudios también se han realizado directamente en las bayas de uva intacta con el fin de determinar las antocianinas totales, la concentración de antocianos extraíbles a pH igual a 1.0 y 3.2, la concentración de polifenoles totales, la concentración de azúcares y la densidad utilizando espectroscopia cercana al infrarrojo (Ferrer et al., 2010). Cozzolino et al. (2003) determinaron el contenido en fenoles de uva. Los resultados presentaron un valor del  $R^2$  entre 0.83 y 0.97. Ferrer et al. (2010) determinaron compuestos fenólicos de la piel de uvas durante su maduración por NIRS. Los resultados de este trabajo muestran que los modelos desarrollados utilizando la tecnología NIRS, junto con herramientas quimiométricas permite la cuantificación de los compuestos fenólicos totales y las familias de compuestos fenólicos en el hollejo de la uva a lo largo de la maduración. La validación de estos modelos mostraron los mejores resultados para la determinación de los flavanoles (diferencias entre HPLC y NIRS de 7.8% a partir de uvas y un 10.7% con pieles de uva) en el procedimiento de validación externa. También se obtuvieron buenos resultados en la validación externa para la determinación de compuestos fenólicos totales (diferencias del 11.7% con uva y el 14.7% con pieles de uva). Los mejores resultados se obtuvieron, en general, utilizando una sonda de fibra óptica obteniendo directamente los espectros de las uvas intactas, lo que puede ser atribuible a la práctica ausencia de manipulación de las muestras que se necesita.

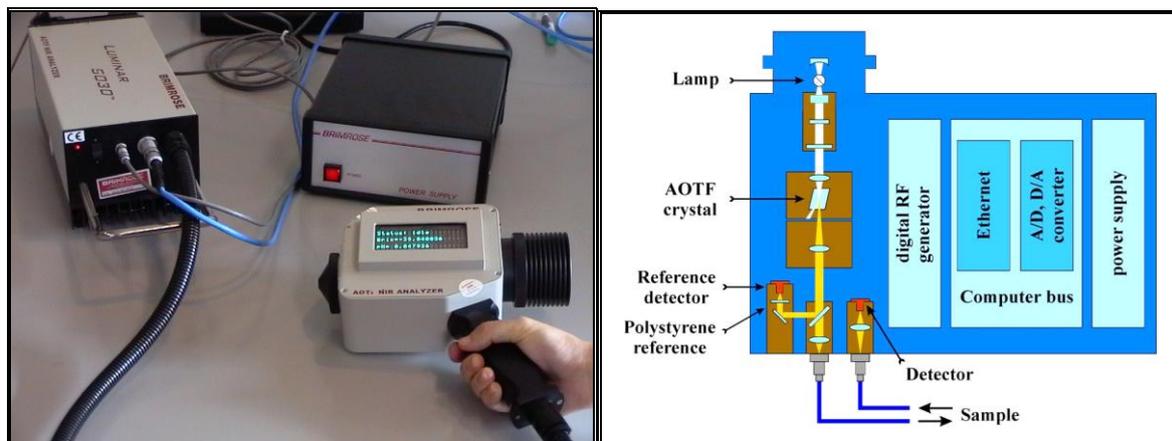
En este trabajo, se utiliza la tecnología NIRS para predecir el contenido de los polifenoles malvidina y pionidina, los °Brix y el color de la uva de mesa 'Crimson'.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis NIR se recogieron uvas de mesa de la variedad ‘Crimson’ producidas en “Herdade Vale da Rosa” de la zona de Ferreira do Alentejo, Sur de Portugal, recolectadas la campaña de septiembre de 2010. Las muestras fueron trasladadas a las dependencias del Departamento de Fitotecnia de la Universidad de Evora y conservada a 2°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 2 semanas. En el mes de octubre, fueron trasladadas al Laboratorio de Tecnología de Posrecolección del Departamento de Proyectos e Ingeniería Rural de la Universidad Pública de Navarra. De la muestra origen se seleccionaron 110 granos de uva de diferentes racimos y de diferentes posiciones dentro del racimo y fueron individualmente identificados. De cada uva se ha determinado su espectro de reflectancia en la región comprendida entre el 1100 y los 2300 nm, su color, los grados Brix, el contenido en polifenoles por HPLC, el peso de la pulpa y de la piel.

Para la obtención de los espectros se ha utilizado un espectrofotómetro modelo AOTF-NIR Luminar 5030 de la empresa Brimrose (Figura 1). Este equipo utiliza la tecnología AOTF (filtro acusto-óptico sintonizable). Tiene un detector InGaAs y el fundamento básico de su funcionamiento es el siguiente: un haz de luz se dirige hacia la muestra, choca con la misma y la luz reflejada es recogida por el detector que envía la información al ordenador tal y como se indica en la Figura 1 (b). Se utiliza el rango espectral 1100-2300 nm, siendo el intervalo seleccionado de 2 nm. Para realizar una medición, el espectrofotómetro toma 50 espectros y proporciona el espectro medio.

Una vez obtenidos los espectros, se realiza un suavizado para eliminar el ruido y, por último, se expresan las medidas de reflectancia como  $\log(1/R)$ .



**Figura 1.-** a) Espectrofotómetro AOTF-NIR Luminar 5030. b) Esquema de funcionamiento del espectrofotómetro Luminar 5030 ([www.brimrose.com](http://www.brimrose.com))

La determinación cuantitativa del contenido de polifenoles requiere de un método analítico de comparación, en este caso se utilizará un HPLC Dionex, Ultimate 3000. Una vez superada la fase de calibración, seremos capaces de establecer el contenido de polifenoles de cada baya sin necesidad de esta técnica destructiva y lenta, sino utilizando los datos obtenidos de los espectro NIR. En el momento de preparar las muestras para el HPLC, se determinó el peso de la pulpa y de la piel de cada una de las bayas con una balanza de precisión.

Para medir el color de las bayas enteras se ha utilizado un espectrofotómetro Minolta, modelo CM-2500d. El espectrofotómetro utilizado toma medidas en el intervalo de longitudes de onda de 360 a 740 nm cada 10 nm. El espacio de color elegido es el definido como CIELab ( $L^*a, b$ ) y el iluminante elegido para la realización de las muestras es el D65.

La cantidad de sólidos solubles totales en el jugo de la fruta se ha determinado con un refractómetro que mide la desviación de la luz polarizada al atravesar una solución. La desviación se mide sobre una escala que está graduada en grados Brix. El refractómetro utilizado fue el modelo digital DR-101 BRIX de la marca IVYMEN con compensación automática de temperatura, rango de medida de 0 a 35% Brix y rango de temperatura de 0 a 40°C.

El análisis estadístico se ha realizado con el programa UNSCRAMBLER y las pruebas utilizadas serán la regresión lineal múltiple. Un 80% de las muestras se han utilizado para obtener las calibraciones de calibración, el 20% restante se reservaron para validar dicha calibración.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se resumen los principales descriptores estadísticos de las muestras y variables analizadas. En ella podemos observar como en todos los modelos obtenidos para predecir las variables por NIRS presenta errores tanto de calibración como de validación (cruzada e independiente) inferiores a los valores de desviación obtenidos por los métodos clásicos. Los mejores modelos se han conseguido en la predicción de los °Brix y el peor modelo ha sido para la variable L del color de las uvas.

Con el fin de evaluar los modelos obtenidos por la tecnología NIRS, se ha realizado una validación interna con muestras pertenecientes al grupo de calibración después de la eliminación de valores atípicos (outliers). El valor de SECV nos indica la calidad de la calibración. También se ha realizado una validación externa con muestras independientes (un 20%) que no habían sido utilizadas para el modelo. Esta validación se realizó para comprobar la robustez del método. Los modelos de calibración obtenidos se aplicaron a las muestras independientes y los valores pronosticados fueron comparados con los datos de referencia. En este caso, destacamos el parámetro estadístico SEP (error estándar de predicción en la muestra de validación independiente) para volver a verificar el modelo obtenido.

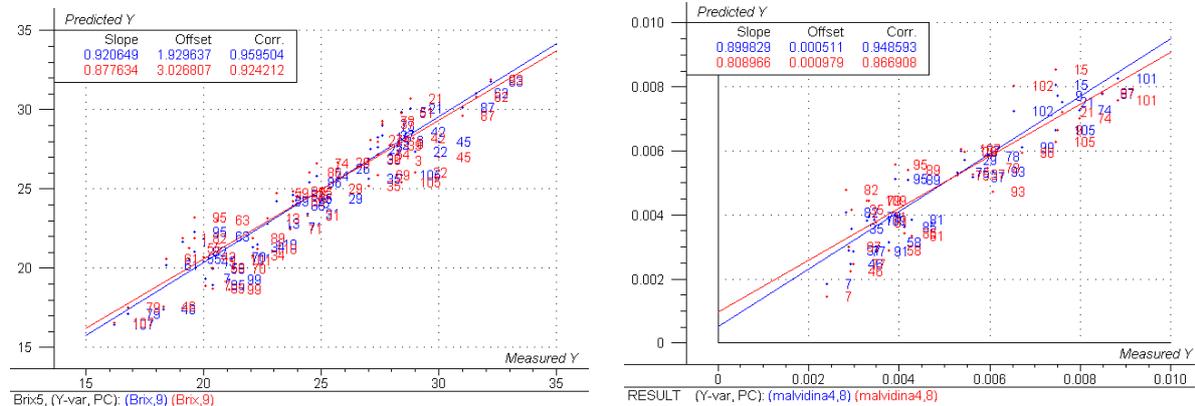
*Tabla 1.-Descriptores estadísticos de los modelos de calibración por NIRS en uva intacta.*

<b>Variables</b>	<b>N</b>	<b>MEDIA</b>	<b>m</b>	<b>M</b>	<b>SD</b>	<b>r</b>	<b>SEC</b>	<b>SECV</b>	<b>SEP</b>
<b>Pionidina</b>	61	0.0115	0.0037	0.04753	0,0069	0.83	0.002	0.002	0.003
<b>Malvidina</b>	57	0.005	0	0.0100	0.002	0.95	$6 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$	$9 \times 10^{-4}$
<b>a</b>	110	12.340	1.875	5.734	2.253	0.81	1.228	1.323	1.056
<b>Color b</b>	110	2.716	-3.280	-1.290	1.146	0.81	0.683	0.749	0.536
<b>L</b>	110	40.467	27.609	34.198	2.042	0.76	1.410	1.23	0.885
<b>°Brix</b>	110	24.500	16.200	34.300	4.250	0.96	1.145	1.556	2.165

N: número de muestras; m: mínimo; M: máximo; SD: desviación estándar; r: coeficiente de correlación; SEC: error estándar de calibración; SECV: error estándar de validación cruzada; SEP: error estándar de predicción en la muestra de validación independiente.

En la figura 2 podemos ver las representaciones gráficas de dos de los modelos obtenidos, en concreto el de los grado Brix y el de Malvidinas. Se muestran los valores pronosticados por NIRS frente a los valores obtenido en el refractómetro. Podemos observar

la proximidad entre la recta de calibración y la de validación con pendientes muy próximas a la unidad, lo que nos da una idea de la calidad del modelo obtenido.



**Figura 2.-** Recta de regresión del modelo de calibración y de predicción de los grados Brix (izda) y Malvidinas (dcha).

#### 4. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que los modelos desarrollados utilizando la tecnología NIRS junto con herramientas quimiométricas nos permiten la determinación directa sobre la uva entera de la concentración de polifenoles, del color y de los sólidos solubles totales. La técnica utilizada en este trabajo es una buena opción para una cuantificación rápida de polifenoles y los resultados son comparables con otros métodos de análisis de alto costo y que requieren mucho tiempo. El desarrollo y la aplicación de esta técnica podría convertirse en una herramienta precisa y eficaz para ayudar a la toma de decisiones en tiempo de cosecha. Sin embargo, un estudio completo debería hacerse con el fin de evaluar los factores, tales como zonas de producción de diferentes variedades de uva y, en el desarrollo de estos modelos.

#### 5. BIBLIOGRAFIA

- Arana I., Jaren C. y Arazuri S. 2005. *Maturity, variety and origin determination in white grapes (Vitis Villifera L.) using near infrared reflectance technology*. Journal of Near Infrared Spectroscopy 13(6), 349-357.
- Cozzolino D., Kwiatkowski M.J., Parker M. Gishen M., Damberg R.G., Cynkar W.U., y Herderich M.J. (2003) *Measurement of phenolic compounds during red wine fermentation by near infrared transmission (NIT) spectroscopy*. The Australian Wine Research Institute.
- Ferrer-Gallego R., Hernández-Hierro J.M., Rivas-Gonzalo J.C., Escribano-Bailón M.T. (2010). *Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy*. LWT - Food Science and Technology 44 (2011) 847-853.
- Jarén C., Ortuño J.C., Arazuri S., Arana J.I. y Salvadores M.C. (2001). *Sugar Determination in Grapes Using NIR Technology*. International Journal of Infrared and Millimeter Waves, Vol. 22 (10): 1521- 1530.
- McGoverin C.M., Weeranantaphan J., Downey G. y Manley M. (2010). *Review: the application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 18, 87-111.