

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**E.T.S. DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DE MONTES**

***DEPARTAMENTO DE BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS***



***“Determinación no destructiva de parámetros de calidad  
en uvas, racimos y mostos mediante Espectroscopía de  
Reflectancia en el Infrarrojo Cercano”***

**TESIS DOCTORAL**

***Virginia González Caballero***

**Directoras:**

**Dra. M<sup>a</sup> Teresa Sánchez Pineda de las Infantas  
Dra. Dolores Pérez Marín**

2012

TÍTULO: *Determinación no destructiva de parámetros de calidad en uvas, racimos y mostos mediante Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano*

AUTOR: *Virginia González Caballero*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



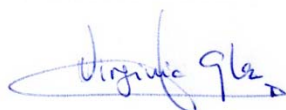
Departamento de Bromatología  
y Tecnología de los Alimentos

***“Determinación no destructiva de parámetros de calidad  
en uvas, racimos y mostos mediante Espectroscopía de  
Reflectancia en el Infrarrojo Cercano”***

**TESIS**

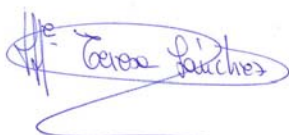
para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba presentada por la  
Licenciada en Enología Dña. *Virginia González Caballero*

*La Doctoranda*



*Fdo.: Virginia González Caballero*

VºBº Las Directoras



*Fdo.: Profª. Dra. Mª Teresa Sánchez  
Pineda de las Infantas*



*Fdo.: Profª. Dra. Dolores Pérez Marín*





Departamento de Bromatología  
y Tecnología de los Alimentos

M<sup>a</sup> TERESA SÁNCHEZ PINEDA DE LAS INFANTAS, Catedrática de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba y DOLORES PÉREZ MARÍN, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba

#### **INFORMAN:**

Que la Tesis titulada “**DETERMINACIÓN NO DESTRUCTIVA DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN UVAS, RACIMOS Y MOSTOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO**”, de la que es autora Dña. Virginia González Caballero, ha sido realizada bajo nuestra dirección durante los años 2008, 2009, 2010, 2011 y 2012; y cumple las condiciones académicas exigidas por la Legislación vigente para optar al título de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente informe en Córdoba a 12 de abril de 2012

Fdo.: Prof<sup>a</sup>. Dra. M<sup>a</sup> Teresa Sánchez  
Pineda de las Infantas

Fdo.: Prof<sup>a</sup>. Dra. Dolores Pérez Marín





## **TÍTULO DE LA TESIS:**

DETERMINACIÓN NO DESTRUCTIVA DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN UVAS, RACIMOS Y MOSTOS MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO

## **DOCTORANDA:**

VIRGINIA GONZÁLEZ CABALLERO

### **INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La Tesis cuyo título se menciona arriba ha podido adaptarse, desde sus inicios, a la metodología y el diseño programados, derivando todo ello en la obtención de resultados de indudable relevancia científica y tecnológica.

En primer lugar, hay que destacar que del trabajo de esta Tesis se han establecido las bases científico-técnicas para el desarrollo de modelos de predicción NIRS cuantitativos y se han obtenido un amplio abanico de aplicaciones NIRS relativas a la determinación de parámetros de calidad interna de uva, relacionados principalmente con el contenido de azúcares y la acidez, para la cuantificación no destructiva de los cambios químicos que tienen lugar durante la maduración de los racimos en la vid, y para facilitar la toma de decisiones sobre el momento óptimo de cosecha. Se han ensayado distintas formas de presentación de muestra a los instrumentos: racimo, grano y mosto, obteniéndose con el racimo, modelos de adecuada capacidad predictiva, similar a la obtenida con el grano, lo que permite el realizar análisis *in situ*, en campo, y en la recepción en la industria, facilitando de esta forma una recolección selectiva de los racimos de uva, dependiendo del tipo de vino a elaborar. Por otro lado, se han desarrollado modelos NIRS destinados a la determinación de los cambios físico-químicos (disminución de la masa volúmica) que se producen durante la fermentación alcohólica, llevando a cabo la aplicación de esta tecnología en el proceso completo de



transformación de la uva en vino. Asimismo, se han determinado para las distintas aplicaciones desarrolladas en este Trabajo de Investigación los instrumentos NIRS más idóneos en función, tanto de las necesidades del campo y de la industria de enológica, como de los parámetros de interés elegidos y de las características intrínsecas del producto. Lo anteriormente expuesto justifica plenamente que la forma más idónea de presentación de esta Tesis Doctoral sea el compendio de publicaciones científicas.

La doctoranda ha tenido la posibilidad de formarse, no sólo en aspectos científicos-técnicos ligados a la tecnología NIRS, sino también relacionados con la ingeniería y tecnología enológica. Asimismo, la doctoranda ha complementado su formación realizando una estancia de 3 meses en el Department of Science of Production and Innovation in the Mediterranean Agriculture & Food Systems (PRIME) de la Università degli Studi di Foggia (Italia) bajo la supervisión del Prof. Dr. Giancarlo Colelli.

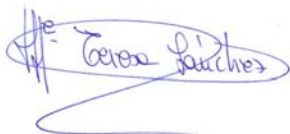
Los trabajos publicados relacionados con los resultados de la Tesis son los siguientes:

1. 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, 158-165.
2. González-Caballero, V.; Pérez-Marín, D.; López, M.I.; Sánchez, M.T. 2011. Optimization of NIR spectral data management for quality control of grape bunches during on-vine ripening. *Sensors*, 11, 6109-6124.
3. González-Caballero, V.; Sánchez, M.T.; López, M.I.; Pérez-Marín, D. 2012. On-Vine Monitoring of Grape Ripening Using Near-Infrared Spectroscopy. *Food Analytical Methods*. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3. Online First, 13 March 2012.

4. Fernández-Navales, J.; López, M.I.; González-Caballero, V.; Ramírez, P.; Sánchez, M.T. 2011. Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation. International Journal of Food Sciences and Nutrition 62, 353-359.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 10 de abril de 2012



Fdo.: María Teresa Sánchez  
Pineda de las Infantas



Fdo.: Dolores Pérez Marín



*A mi madre,  
ejemplo de mujer trabajadora  
por su tesón, sacrificio  
y profesionalidad.*



## **Agradecimientos**



Deseo expresar mi sincera gratitud y reconocimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo de Investigación:

A la Dra. María Teresa Sánchez Pineda de las Infantas, Catedrática de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y codirectora de esta Tesis.

A la Dra. Dolores Pérez Marín, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Producción Animal de la Universidad de Córdoba, y codirectora de esta Tesis.

A la Dra. M<sup>a</sup> Isabel López Infante, Profesora Asociada del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba.

A la Dra. Brígida Jiménez Herrera, Directora del IFAPA Centro de Cabra, de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, así como a todos mis compañeros en este Centro. Agradezco especialmente la colaboración de la Dra. Pilar Ramírez, de D. José Marín, de D. Francisco Zamorano, de Dña. Anabel Lucena y de D. José Morales.

A los Departamentos de Bromatología y Tecnología de los Alimentos y Producción Animal de la Universidad de Córdoba.

A mi familia, por su apoyo incondicional durante todo el tiempo que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral.

A mi marido Juan, por su inmensa ayuda, sin él no hubiera finalizado esta Tesis Doctoral.

Por último, a todos aquellos que durante estos años se han interesado por el desarrollo de esta Tesis, muchas gracias.





## Índice



---

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>Capítulo 2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>2.1. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>17</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>17</b>
<b>Capítulo 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>3.2. EL SECTOR VITIVINÍCOLA: PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN.</b>	<b>22</b>
<b>3.3. LA CALIDAD DE LA UVA DESDE EL VIÑEDO</b>	<b>24</b>
<b>3.3.1. El material vegetal</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2. Factores precosecha</b>	<b>28</b>
<i>3.3.2.1. El suelo</i>	<i>28</i>
<i>3.3.2.2. El clima</i>	<i>30</i>
<b>3.3.3. Factores humanos: Técnicas de cultivo</b>	<b>31</b>
<i>3.3.3.1. La poda</i>	<i>31</i>
<i>3.3.3.2. El riego y el abonado</i>	<i>33</i>
<b>3.4. LA MADURACIÓN</b>	<b>34</b>
<b>3.4.1. Seguimiento de maduración</b>	<b>35</b>
<b>3.4.2. La toma de muestras</b>	<b>36</b>
<b>3.4.3. Determinación de la fecha de vendimia</b>	<b>37</b>
<b>3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS TRADICIONALES DE DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DE CALIDAD EN UVAS</b>	<b>39</b>
<b>3.5.1. Contenido en sólidos solubles totales</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2. Azúcares reductores</b>	<b>40</b>
<b>3.5.3. Acidez titulable y pH</b>	<b>41</b>
<b>3.5.4. Ácido tartárico</b>	<b>41</b>
<b>3.5.5. Ácido málico</b>	<b>42</b>
<b>3.5.6. Potasio</b>	<b>43</b>
<b>3.6. LA TECNOLOGÍA DE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS)</b>	<b>43</b>

<b>3.6.1. Bases teóricas</b>	<b>45</b>
<b>3.6.2 Bases instrumentales</b>	<b>47</b>
<b>3.6.3. Análisis quimiométrico de datos espectroscópicos NIRS.</b>	<b>54</b>
3.6.3.1. <i>Análisis de Componentes Principales (ACP)</i>	56
3.6.3.2 <i>Análisis cuantitativo. Calibración multivariante</i>	57
3.6.3.3. <i>Análisis cualitativo</i>	63
<b>3.7. APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS PARA EL CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD EN EL SECTOR VITIVINÍCOLA</b>	<b>68</b>
<b>3.7.1. Determinaciones cuantitativas de los principales parámetros de calidad en uva utilizando NIRS</b>	<b>69</b>
3.7.1.1. <i>Determinaciones cuantitativas at-line de los principales parámetros de calidad en uva utilizando NIRS</i>	71
3.7.1.2. <i>Determinaciones cuantitativas in situ de los principales parámetros de calidad en uva utilizando NIRS</i>	79
<b>3.8. REFLEXIONES FINALES SOBRE EL ESTADO DE DESARROLLO DEL ANÁLISIS NIRS EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA</b>	<b>84</b>
<b>Capítulo 4. LA TECNOLOGÍA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD INTERNA, DETERMINACIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO DE COSECHA Y CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA</b>	<b>89</b>
<b>4.1. 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, 158–165 (2010)</b>	<b>89</b>
<b>4.2. EVALUATION OF DIFFERENT REGRESSION STRATEGIES FOR INTERNAL QUALITY CONTROL OF GRAPE BUNCHES DURING ON-VINE RIPENING. SENSORS 11, 6109-6124 (2011)</b>	<b>99</b>
<b>4.3. ON-VINE MONITORING OF GRAPE RIPENING USING NEAR INFRARED SPECTROSCOPY. FOOD ANALYTICAL METHODS (2012)</b>	<b>117</b>
<b>4.4. FEASIBILITY OF USING A MINIATURE NIR SPECTROMETER TO MEASURE VOLUMIC MASS DURING ALCOHOLIC FERMENTATION. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCES AND NUTRITION 62, 353–359 (2011)</b>	<b>129</b>

---

<b>Chapter 5. CONCLUSIONS</b>	<b>141</b>
<b>Capítulo 6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>147</b>



---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b>	<b>Valores de los estadísticos de RPD y RER relacionados con el control NIRS de productos y procesos</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Criterios de interpretación de los valores del coeficiente de variación en relación con el control NIRS de productos y procesos</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 3</b>	<b>Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis <i>at-line</i></b>	<b>72</b>
<b>Tabla 4</b>	<b>Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis <i>in situ</i></b>	<b>80</b>





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<b>Formas de análisis NIRS de los productos agroalimentarios (adaptado de Kawano, 2002)</b>	<b>48</b>
<b>Figura 2</b>	<b>Componentes básicos de un instrumento NIRS</b>	<b>50</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Componentes básicos de un instrumento NIRS de red de diodos</b>	<b>51</b>
<b>Figura 4</b>	<b>Componentes básicos de un instrumento NIRS-MEMS</b>	<b>52</b>
<b>Figura 5</b>	<b>Instrumento portátil NIR-MEMS Phazir<sup>TM</sup></b>	<b>53</b>



## **Abreviaturas**



A: Absorbancia.  
ACP: Análisis de Componentes Principales.  
AT: Acidez titulable.  
CE: Comunidad Europea.  
CH: Enlace carbono-hidrógeno.  
CP: Componente Principal.  
CPs: Componentes Principales.  
CV: Coeficiente de Variación de un constituyente químico, calculado como  $dt/media$ .  
CVETL: Coeficiente de Variación del estadístico ETL, calculado como  $ETL/media$ .  
CVETVC: Coeficiente de Variación del estadístico ETVC, calculado como  $ETVC/media$ .  
dt: Desviación típica.  
DT: Detrending.  
DTS: Digital Transform Spectroscopy.  
ETC: Error Típico de Calibración.  
ETL: Error Típico de Laboratorio (método de referencia).  
ETP: Error Típico de Predicción.  
ETSIAM: Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes.  
ETVC: Error Típico de Validación Cruzada.  
EE.UU.: Estados Unidos.  
FAO: Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.  
FT-NIR: NIR con transformada de Fourier.  
H: Distancia de H, estadístico análogo a la Distancia de Mahalanobis.  
HR: Humedad relativa.  
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.  
MARM: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.  
MEMS: Micro-Electro-Mechanical System.  
MIR: Mid Infrared, Infrarrojo medio.  
MPLS: Modified Partial Least Squares, Mínimos Cuadrados Parciales Modificados.  
MSC: Multiplicative Scatter Correction, Corrección multiplicativa del efecto “scatter”.  
NH: Enlace nitrógeno-hidrógeno.  
NIR: Near Infrared, Infrarrojo cercano.  
NIRS: Near Infrared Spectroscopy, Espectroscopía en el infrarrojo cercano.  
nm: Nanómetros.

OH: Enlace oxígeno-hidrógeno.

PLS: Partial Least Squares, Mínimos Cuadrados Parciales.

r y R: Coeficientes de correlación.

$r^2$  y  $R^2$ : Coeficientes de determinación.

RCP: Regresión en Componentes Principales.

RER: Range Error Ratio, Cociente entre el intervalo de composición de los datos de referencia y el ETVC.

RLM: Regresión Lineal Múltiple.

RPD: Residual Predictive Deviation, Cociente entre la desviación típica de la composición de los datos de referencia y el ETVC.

SNV: Standard Normal Variate.

SST: Sólidos solubles totales.

T: Estadístico T, análogo a una t de Student.

UCO: Universidad de Córdoba.

UE: Unión Europea.

UV: Ultravioleta.

VIS: Visible.

## **Resumen**





---

## RESUMEN

La Espectroscopía de Infrarrojo Cercano (NIRS) se ha convertido en una técnica analítica muy útil para la determinación no destructiva de parámetros de calidad en alimentos, adaptándose plenamente a las exigencias de la industria vitivinícola en términos de control de calidad y trazabilidad.

Aunque el número de aplicaciones NIRS en el proceso de elaboración de vinos se ha incrementado en los últimos años, el uso de la espectroscopía NIR en la industria vitivinícola se encuentra todavía en una etapa de desarrollo muy incipiente, siendo necesaria la optimización del empleo de sensores NIRS en dicha industria. En este sentido, la determinación de calidad de las uvas en campo y en bodega, directamente sobre el racimo, significaría un importante avance para el sector enológico. Ello permitiría no sólo el realizar el seguimiento del proceso de maduración en campo - lo que facilitaría la toma de decisiones respecto al momento óptimo de vendimia - sino también posibilitaría la rápida medición de los parámetros de calidad de la uva a su llegada a bodega, lo que permitiría acelerar la toma de decisiones en esta etapa, posibilitando el procesado por separado de lotes en función de la calidad inicial de la materia prima, evaluada de forma precisa y exacta, antes de su elaboración.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido desarrollar modelos NIRS precisos y robustos destinados a la determinación de los principales parámetros de calidad interna (contenido de sólidos solubles y en azúcares reductores, pH, acidez titulable, contenidos en ácido tartárico, ácido málico, y en potasio) de uvas de vinificación durante su maduración en campo, en el momento de cosecha y en su recepción en bodega, utilizando el racimo como forma de presentación de muestra a los instrumentos, con el fin de permitir a los agricultores y bodegueros, el uso rutinario de la tecnología NIRS en la industria vitivinícola para predecir con mayor precisión el momento óptimo de vendimia y la calidad inicial de las uvas a su llegada a la industria, garantizando así la más alta calidad posible tanto de la uva como del vino a elaborar. Con este propósito se han evaluado igualmente dos espectrofotómetros comercialmente disponibles, uno muy adecuado para efectuar mediciones *in situ*, directamente en las

cepas (espectrofotómetro basado en la tecnología MEMS) y el otro idóneo para su utilización en las líneas de elaboración en bodega (espectrofotómetro de red de diodos).

Asimismo, el presente Trabajo de Investigación analizó la viabilidad de utilizar un espectrofotómetro NIR miniatura, de bajo coste, para la predicción de la masa volúmica en vinos blancos y tintos durante la fermentación alcohólica, tratando de identificar al mismo tiempo las longitudes de onda más significativas asociadas a la determinación de dicho parámetro.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que la capacidad predictiva de los modelos desarrollados para la determinación de parámetros de calidad interna en uvas, empleando el racimo como modo de presentación de muestra, fueron similares a los obtenidos al utilizar bayas y mosto, lo que permite la aplicación de la tecnología NIRS para el análisis no destructivo de uvas en campo, durante la maduración de la vid, como a su llegada a la bodega, empleando para el caso de las determinaciones *in situ* en cepas, el instrumento NIR-MEMS seleccionado, mientras que en la bodega se utilizó el de red de diodos.

En este sentido, el análisis de las uvas utilizando el racimo debe ser considerado como un primer paso en el empleo de la tecnología NIRS para el control de calidad *in situ* y en línea en la industria enológica, ya que ésta es la forma en la que se lleva a cabo el desarrollo de las uvas en las cepas, así como su recepción en bodega. Este Trabajo de Investigación ha sido el primer intento de utilización de la espectroscopía NIR tanto a nivel de campo como de bodega, empleando como forma de presentación de muestra al instrumento aquella en la que se lleva a cabo el desarrollo y recepción del fruto en la industria vitivinícola.

Por otra parte, los resultados obtenidos confirman que la espectroscopía NIR es sensible a los cambios físicos/químicos (disminución de la masa volúmica) que se producen durante la fermentación alcohólica, en el rango espectral de 800 a 1050 nm. Asimismo, se llevó cabo la identificación de seis longitudes de onda fuertemente correlacionadas con la masa volúmica, las cuales podrían ser utilizadas para desarrollar un instrumento simple, eficiente, de bajo costo que podría emplearse también, para determinar el contenido de azúcares reductores en vinos durante la fermentación.

Por tanto, los resultados obtenidos de este Trabajo de Investigación muestran la viabilidad de la utilización de la tecnología NIRS para cuantificar los cambios químicos que ocurren durante el proceso de maduración de la uva de vinificación en campo y la determinación del momento óptimo de recolección, así como durante el proceso de fermentación, lo que facilitaría la incorporación de NIRS en la industria vitivinícola, ayudando tanto a agricultores como a bodegueros a la toma de decisiones en tiempo real.



## **Abstract**



**ABSTRACT**

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is becoming a more attractive analytical technique for measuring quality parameters in food products, showing considerable promise for their non-destructive analysis, and is ideally suited to the requirements of the wine industry in terms of both quality control and traceability.

Although the number of winemaking applications for which NIRS could be used has increased over the last few years, NIR spectroscopy in the wine industry is still in its infancy. Clearly, more can be done to optimize the use of NIRS sensors in the wine industry; the measurement of quality properties directly on the bunch would in this sense mark a considerable step forward. It would enable not only on-vine measurements during ripening – thus facilitating decisions regarding harvest timing – but also rapid measurement of quality parameters as the grapes arrive at the winery, thus speeding up decision making at that stage and enabling separate processing of batches depending on the initial quality of the raw material, assessed prior to processing.

The main objective of this PhD dissertation was to develop accurate and robust NIRS models for measuring major internal quality parameters in intact wine grapes (soluble solid content, reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid, and potassium content) during ripening as a function of grape position and bunch orientation, and at harvest, regardless of growing season or variety, with a view to enabling growers and producers to routinely use NIRS technology under field conditions and at the reception in the winery to predict more precisely the timing of their harvest operations and the initial quality of the grapes on the arrival at the industry, and thus ensure the highest possible grape and wine quality. Two commercially available spectrometers were evaluated for this purpose, one of which is highly suited to field measurement (MEMS-based spectrometer) and the other better suited to on-line use in the winery (diode-array spectrophotometer).

Furthermore the present study sought to assess the feasibility of using a miniature low-cost NIR spectrometer to predict volumic mass in red and white wines during alcoholic fermentation and to identify the most significant wavelengths associated with



volumic mass, with a view to support instrument developers in the design of even more simple and inexpensive miniature spectrometers.

Significantly, the results obtained with bunch presentation were similar to those obtained with berries and must, thus justifying further implementation of NIRS technology for the non-destructive analysis of quality properties both during on-vine ripening and on arrival at the winery, using a handheld NIR-MEMS spectrometer and a diode array instrument, respectively. This method allows musts to be processed separately depending on initial grape quality.

Analysis of grapes in bunch form should be considered a first step in the tuning of NIRS technology for on-site and on-line control purposes, since it is the form in which the grape grows, and in which it arrives at the winery. To our knowledge, this is the first attempt to implement NIR spectroscopy on-vine for this purpose.

Moreover, NIR spectroscopy was sensitive to physical/chemical changes (decrease in volumic mass) taking place during alcoholic fermentation, across the spectral range 800– 1,050 nm. Six wavelengths were identified as correlating strongly with volumic mass, and could be used to develop a simple, efficient, low-cost instrument that could also be used to measure reducing-sugar content in wines throughout fermentation.

The results showed that changes in grapes and musts quality parameters can be measured non-destructively, with a single spectrum measurement and in a matter of seconds, during both on-vine ripening and wine making process, paving the way for using NIRS technology to assist growers and producers in making decisions in the enological sector.

## **Capítulo 1**



## Capítulo 1. INTRODUCCIÓN

España es el primer viñedo del mundo, con 1.113.000 hectáreas plantadas (el 6,2% del conjunto de las tierras de cultivo), siendo asimismo, el tercer productor y el segundo exportador mundial de vino (MARM, 2011).

El control de calidad, la seguridad alimentaria y la trazabilidad son hoy en día objetivos de la producción vitivinícola, siendo fundamental por parte de la industria enológica garantizar estos aspectos al consumidor. En la actualidad, la tendencia mundial es hacia el consumo de vinos de calidad, VCPRD (vino de calidad producido en una región determinada), una indicación geográfica que garantiza el origen y la calidad de los vinos en la Unión Europea (MARM, 2008). Igualmente, el Instituto Español de Comercio Exterior (ICEX) en su labor por promover las exportaciones de los vinos basa su nueva estrategia en la imagen de calidad (ICEX, 2011).

Para fomentar las perspectivas de futuro de la industria vitivinícola es necesario, por tanto, invertir en investigación y en innovación, específicamente en la utilización de nuevas tecnologías de aseguramiento de la calidad y la trazabilidad de materias primas, productos y procesos que mejoren la calidad de los vinos.

Desde los organismos oficiales también se promueve la elaboración de vinos de calidad, y son continuos los programas de financiación que cada año se llevan a cabo para la promoción de los mismos (MARM, 2011). Según la Organización Común del Mercado Vitivinícola, en 2009 se ejecutaron 161 programas, con una inversión cercana a los 14 millones de euros. En 2010 este número aumenta hasta los 420 programas con un importe cercano a los 60 millones de euros. Para la convocatoria de 2011, se aprobaron en la Conferencia Sectorial de Agricultura y Desarrollo Rural, del 7 julio, un total de 760 programas con un presupuesto superior a los 87 millones de euros (MARM, 2011).

Asimismo, el Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA) ha identificado como una de las áreas temáticas de investigación en el sector vitivinícola, la calidad y composición de la uva y del vino a través del control de

maduración de la uva mediante parámetros de calidad objetivos y de rápida realización (MARM, 2008).

El hecho de conocer los principales parámetros de calidad interna de la uva, permitiría a la industria enológica el poder realizar las correcciones necesarias en caso de pH altos y valores de acidez titulable bajos, así como correcciones en mostos con bajos contenidos en azúcares, adicionando mostos concentrados o mostos concentrados rectificadas, estando dichas correcciones destinadas a obtener vinos de alta calidad.

Es obvio, según lo expuesto anteriormente, que el sector vitivinícola requiere de nuevas tecnologías rápidas, limpias y precisas para cumplir con los objetivos que marca el mercado, basados en una política de calidad y seguridad alimentaria, y apostando por una diferenciación de productos para alcanzar mayor valor añadido en el mercado.

La Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), es hoy en día, una de las alternativas más adecuadas para hacer frente a las exigencias de la industria vitivinícola, ya que es una técnica no destructiva que combina rapidez y precisión en la medida, con una gran versatilidad, sencillez de presentación de la muestra, velocidad de recogida de datos (espectros) y bajo coste (Roberts et al., 2004; Garrido-Varo y De Pedro, 2007).

La aplicación de la espectroscopía NIR para el aseguramiento de la calidad en el sector de la uva y del vino ofrece otras ventajas, entre las que destacan: intensificación del volumen de materias primas y productos terminados analizados, análisis a gran escala y toma de decisiones en tiempo real. Asimismo, la espectroscopía NIR tiene un elevado potencial como herramienta para la monitorización del proceso de maduración de la uva en campo, lo que es de particular interés para determinar el momento óptimo de cosecha en función del tipo de vino que se quiere elaborar (González-Caballero et al., 2011).

Dado que NIRS presenta la enorme ventaja de no requerir tratamientos previos de la muestra para su análisis, sería de gran utilidad para la industria enológica, el realizar determinaciones no destructivas de parámetros de calidad interna en uva, utilizando el racimo como forma intacta de presentación de muestra al instrumento,

puesto que ésta es la manera en la cual se encuentra la uva en la cepa y se realiza su recepción en la bodega y asimismo sería de especial interés, disponer de una herramienta para el seguimiento de la maduración en la cepa y la determinación del momento óptimo de cosecha.

El Centro de Cabra del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, junto con los Departamentos de Bromatología y Tecnología de los Alimentos y de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes de la Universidad de Córdoba, tras su experiencia en el análisis tradicional destructivo de productos vitivinícolas, ha iniciado una línea de I+D+i en el marco de los Proyectos de Excelencia AGR-285 "Seguridad y trazabilidad en la cadena alimentaria usando NIRS" y AGR-5129 "Sensores MEMS y NIRS-imagen para el análisis no destructivo e *in situ* de productos animales y vegetales", en la que se enmarca esta Tesis Doctoral, y con la que se pretende establecer un sistema de apoyo a la industria vitivinícola, basado en la aplicación de la huella espectral NIRS en el control de las materias primas, productos y procesos de la industria enológica. En este contexto se plantean los objetivos que se detallan en el siguiente capítulo de este Trabajo de Investigación.

No obstante, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido generar nuevos conocimientos desde el mayor rigor científico que, además de divulgarse en revistas de repercusión científica internacional, pudiesen ser aplicados a la realidad concreta y peculiar del sector vitivinícola.

Parte de los resultados del Trabajo de Investigación desarrollado han sido objeto de publicaciones científicas que se presentan en esta Memoria, directamente en el formato requerido por las diferentes revistas, y constituyen la presente memoria de Tesis Doctoral en la modalidad de compendio de artículos científicos.

Con el fin de facilitar su lectura y comprensión esta Memoria se ha estructurado en los siguientes capítulos:

- En el Capítulo 1, se ha tratado de justificar y clarificar de forma muy breve el Trabajo de Investigación desarrollado en la presente Tesis Doctoral.
- En el Capítulo 2, se exponen y concretan los objetivos a alcanzar.
- En el Capítulo 3, se pone de manifiesto la problemática real que ha servido como justificación y punto de partida del actual estudio. En la primera sección, se presentan los aspectos más relevantes relacionados con la calidad de uvas. En la segunda sección se ha orientado principalmente, a la revisión de los métodos analíticos tradicionales para la determinación de los principales parámetros de calidad en uvas. Por último, y en la tercera sección, se ha realizado una revisión de las bases teóricas, instrumentales y quimiométricas de la tecnología de Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano y de las distintas aplicaciones NIRS, destinadas al control de calidad de uva en campo y en bodega y a la determinación del momento óptimo de cosecha.
- En el Capítulo 4, se presentan las aplicaciones y los resultados obtenidos en forma de artículos de investigación, publicados en revistas científicas de difusión internacional.
- El Capítulo 5, recoge las conclusiones obtenidas en esta Memoria.
- Finalmente, en el Capítulo 6, se indican las referencias bibliográficas utilizadas para la elaboración de este Trabajo de Investigación.

## **Capítulo 2**





## Capítulo 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y evaluación de una metodología de control de calidad rápida, económica, no destructiva, no contaminante y con posibilidades de incorporación en precosecha para el seguimiento de maduración de las uvas en campo y en poscosecha a nivel de líneas de producción en la industria vitivinícola y basada en el uso de sensores NIRS.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos de este Trabajo de Investigación son los siguientes:

1. Desarrollo y evaluación de ecuaciones de calibración NIRS globales para la predicción de parámetros de calidad de la uva durante el seguimiento de maduración y en la recepción en la industria. [El cumplimiento del objetivo ha sido abordado en los siguientes artículos científicos: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. *Sensors* 11 (2011), 6109-6124; y “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. *Food Analytical Methods* 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3].
2. Adaptación de medidas NIRS al seguimiento en campo de la maduración de uvas para vinificación. [El cumplimiento de dicho objetivo ha sido llevado a cabo principalmente en el artículo: “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. *Food Analytical Methods* 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3].

3. Comparación entre instrumentos NIRS de diferentes diseños ópticos para su incorporación en campo y en las líneas de producción en la industria vitivinícola. [*Dicho objetivo ha sido realizado en los artículos de investigación: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. Sensors 11 (2011), 6109-6124; “Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation”. International Journal of Food Sciences and Nutrition (2011), 353-359; y “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. Food Analytical Methods 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3*].
4. Desarrollo de estrategias de calibración avanzadas para la predicción de parámetros de calidad en uva durante el seguimiento de maduración y en su recepción en la industria. [*La cumplimentación de dicho objetivo ha sido llevada a cabo en los artículos científicos: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. Sensors 11 (2011), 6109-6124; y “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. Food Analytical Methods 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3*].

## **Capítulo 3**



## Capítulo 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 3.1. INTRODUCCIÓN

España, con 1.113.000 hectáreas destinadas al cultivo de la vid de las cuales un 97,4% se destinan a vinificación, un 2% a uva de mesa, un 0,3% a la elaboración de pasas y el 0,3% restante a viveros, es el país con mayor extensión de viñedo de la Unión Europea. Representa un 25% de la superficie total de la UE (seguida por Francia e Italia con aproximadamente un 18% cada una) y un 14,5% de la superficie mundial. La vid ocupa en nuestro País el tercer lugar en extensión detrás de los cultivos de cereales y del olivar (ICEX, 2011).

Asimismo, es importante señalar que desde el año 2000, la superficie española sujeta a reconversión y reestructuración ha superado las 100.000 hectáreas, lo que representa una inversión cercana a los 650 millones de euros.

En Andalucía, la superficie total de uva para vinificación es de 34.308 hectáreas, de las que el 98,9% están en producción, en concreto 33.920 ha, siendo la gran mayoría de secano. Por provincias, el 33% del viñedo se concentra en Cádiz y el 24% en Córdoba (MARM, 2011). En dicha Comunidad Autónoma, e igualmente desde el año 2000, también se ha llevado a cabo la reestructuración y reconversión del viñedo, favorecido por las ayudas comunitarias. Estas ayudas han supuesto una importante medida para impulsar el desarrollo del sector, mejorar las estructuras productivas de las explotaciones y adaptar la producción, mediante el cambio varietal, a las actuales demandas del mercado.

España cuenta con 85 zonas de producción de vinos de calidad con Denominación de Origen Protegida (DOP), de ellas 67 son Denominaciones de Origen, 2 Denominaciones de Origen Calificada, 6 son Vinos de Calidad con Indicación Geográfica y 10 Vinos de Pago (MARM, 2010), las cuales, siguiendo el modelo europeo de producción, mantienen un estricto control sobre la cantidad producida, las prácticas enológicas, y la calidad de los vinos que se producen en cada zona (ICEX, 2011).

La evolución de las DOPs españolas a lo largo de los últimos 28 años pone de manifiesto la inminente demanda del sector vitivinícola hacia vinos de calidad diferenciada. Según los datos publicados por el MARM en 2011, el número de DOPs en la campaña vitivinícola 1982/1983 era de 29, siendo la superficie total nacional de viñedo para transformación de 1.636.100 ha, de las cuales 489.500 ha eran superficie inscrita en las DOPs, lo que suponía un 29,9% de DOPs sobre el total nacional. Los últimos datos disponibles (campaña 2009/10) indican un aumento del número de DOPs a 85 de las cuales 7 pertenecen a Andalucía. Los datos analizados ponen de manifiesto un claro descenso de la superficie total nacional de viñedo para la transformación y un aumento de la superficie inscrita en las DOPs pasando de un 29,9% en la campaña 1982/1983 a un 66,2% en la campaña 2009/2010 (MARM, 2011).

Según la Unión Europea, el futuro está en un sector vitivinícola europeo sostenible y plantea como objetivo mejorar el control de calidad mediante el refuerzo del papel de las organizaciones del sector, en lo que respecta a los procedimientos de clasificación/desclasificación del vino y a las normas de producción (Comisión Europea, 2011). Esto implica la obligación de las empresas vitivinícolas de garantizar y asegurar la calidad y la seguridad alimentaria a lo largo de todo el proceso productivo, siendo necesario, por tanto, establecer sistemas de trazabilidad y de seguridad alimentaria que garanticen este control en las diversas etapas del proceso de elaboración, comenzando en el viñedo, continuando con la elaboración en la bodega y finalizando con la distribución y venta. Por ello, es fundamental que la industria enológica cuente con métodos de aseguramiento de la calidad y trazabilidad que, siendo rápidos, ágiles, eficaces y económicos, permitan cumplir con los niveles y exigencias de calidad y seguridad demandados por los consumidores.

### **3.2. EL SECTOR VITIVINÍCOLA: PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN.**

La Unión Europea ocupa un lugar preponderante en el mercado vinícola mundial. Con una producción anual de 175 millones de hectolitros, representa el 45% de la superficie vitícola del planeta, el 65% de la producción, el 57% del consumo y el 70% de las exportaciones (Comisión Europea, 2011).

Desde que se creó la Organización Común de Mercados, el mercado vinícola ha evolucionado considerablemente (Reglamento (CE) nº 1493/1999, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola (DO L 179 de 14 de julio de 1999). A grandes rasgos cabe distinguir un cortísimo periodo inicial de equilibrio, seguido de una fase de fuerte aumento de la producción aún con una demanda estable y, por último, a partir de la década de los ochenta, una constante disminución del consumo y una acusada tendencia de la demanda hacia la calidad (Comisión Europea, 2011).

La reforma de la OCM de 1999 reafirmó el objetivo de alcanzar un mayor equilibrio entre la oferta y la demanda, ofreciendo a los productores la posibilidad de adaptar la producción a un mercado que exigía más calidad y lograr así para el sector una competitividad duradera en el contexto del aumento de la competencia internacional consiguiente a los acuerdos generales sobre aranceles aduaneros y comercio (GATT), financiándose para ello en la pasada década la reestructuración de una parte importante del viñedo (Comisión Europea, 2011).

Por producción y tipo de vino, Francia ocupa la primera posición como productor de vinos de calidad, con 23,5 millones de hectolitros, frente a los 14 de Italia y los 13,1 de España (ICEX, 2011).

En España, Castilla-La Mancha es la principal región productora con casi un 50% del total. Andalucía ocupa el octavo lugar en producción con 1,16 millones de hectolitros, lo que representa un 3,3% del total nacional, de los que 829.206 hectolitros fueron vinos con DOP (ICEX, 2011).

Italia es el primer exportador del mundo con 18,6 millones de hectolitros, un 22% de los intercambios totales. España ocupa la segunda posición con 14,4 millones de hectolitros exportados, lo que significa un 17% del mercado total, seguida por Francia con 12,5 millones y el 15% (ICEX, 2011).

La evolución de la comercialización en nuestro País durante el período que comprende las campañas 1990/1991 y 2009/2010 pone de manifiesto un claro descenso del mercado interior, pasando de un 64% (campaña 1990/1991) a un 57% (campaña



2009/2010), lo que se traduce en un aumento del mercado exterior en el mismo período que va de un 36% en la campaña 1990/1991 a un 43% en la campaña 2009/2010 (MARM, 2011).

En 2011, y según datos analizados por el Observatorio Español del Mercado del Vino (OEMV), las exportaciones españolas de vino han alcanzado cifras récord, habiendo superado en el interanual de junio los 20 millones de hectolitros con unos aumentos del 24,5% respecto a la campaña anterior (ICEX, 2011).

### **3.3. LA CALIDAD DE LA UVA DESDE EL VIÑEDO**

Las calidades que ofrece una determinada vendimia, englobadas bajo el calificativo de “calidad”, determinan con una estrecha correlación la tipicidad y la calidad del vino elaborado a partir de la misma. Es sabido que los grandes vinos se elaboran a partir de excelentes vendimias, aunque esto no siempre sucede así, pues una buena vendimia puede ser malograda por su incorrecta manipulación en la bodega; no obstante, lo que si es claro, es que partiendo de uvas de calidad media o mala, nunca se puede lograr un excelente vino, por mucho que el enólogo y la tecnología disponible se apliquen en su elaboración. En este caso, la Naturaleza, no puede ser superada (Hidalgo, 2006).

En este sentido es importante señalar que la calidad de la uva y del vino viene fuertemente determinada tanto por la forma de cultivo como por la gestión de la cubierta vegetal a través de diferentes intervenciones culturales. El objetivo debe ser garantizar las condiciones de luz, temperatura y humedad óptimas para un correcto funcionamiento de los sistemas fotosintéticos y de los fenómenos de distribución y acumulación, manteniéndose un estado sanitario óptimo de la vegetación y sobre todo de los racimos (Balsari y Scienza, 2004).

Otro aspecto, muy interesante a destacar en la calidad final del vino es la variabilidad de las bayas en el viñedo. Cada baya funciona de forma independiente y no se sabe, realmente, por qué dos bayas que están muy próximas, en la misma porción del racimo y sometidas a las mismas condiciones, evolucionan de forma tan distinta.

Cuanto mayor es la variabilidad de las bayas peor es la calidad de la vendimia, siendo los dos factores que más influyen en esta variabilidad el tiempo frío antes y durante la floración y el calor en el envero (Martínez de Toda, 2011).

Las grandes añadas corresponden solamente a los viñedos en los que manteniéndose el equilibrio vegetativo adecuado, emplazados en situaciones muy favorables, de gran vocación vitícola, con variedades idóneas, sin estar sometidas a prácticas culturales abusivas (carga de poda y fertilización excesiva), dispongan de una acción heliotérmica elevada, con ausencia de plagas y enfermedades. Una brotación precoz, resultante de una temprana elevación de la temperatura al final de un invierno frío, una parada precoz del crecimiento provocada por la acción de productos heliotérmicos elevados y sin acusada sequía, un largo período de maduración, moderadamente cálido y ampliamente soleado y una vendimia tardía, son todas las condiciones necesarias (Hidalgo, 2002).

Asimismo, la fecha de vendimia condiciona estrechamente la calidad de la uva, porque determina, junto con la parada de crecimiento, el valor del producto heliotérmico durante el período de maduración, siendo éste más elevado para vendimias tardías. Por esta causa aumenta el peligro de la aparición de enfermedades criptogámicas. No obstante, la elección de la fecha de vendimia debe suponer el conocimiento y riesgo de los condicionamientos, aún cuando es ostensible la escasa ganancia de la calidad al final del período de maduración. El adelanto de la vendimia solo está justificado para la elaboración de vinos blancos, jóvenes y afrutados (Hidalgo, 2002).

Aunque el concepto de calidad de uva está en continua evolución, la concentración del azúcar en la uva es un parámetro estrechamente correlacionado con algunos de los más importantes elementos constitutivos del mosto, ya que todo lo que favorece su síntesis provoca también una mayor concentración en términos de aromas, vitaminas y polifenoles porque son sintetizados también a partir de precursores comunes (Balsari y Scienza, 2004).

Así, hoy en día son numerosas las industrias vitivinícolas que utilizan el contenido en azúcares, el pH y la acidez titulable, así como la evaluación visual y cata de la propia uva, como parámetros analíticos de calidad para el seguimiento de la

maduración de la uva debido a su sencillez de análisis, aunque si bien éstos no permiten establecer una relación clara y rigurosa con la calidad final del vino (Cozzolino et al., 2007).

Como ya se ha indicado anteriormente, en numerosas ocasiones los criterios analíticos clásicos para el seguimiento de la maduración no representan un reflejo exacto de la realidad, siendo cada vez más importante determinar otros parámetros tales como contenido en aromas, taninos y los contenidos en ácido málico y ácido tartárico.

Otra dificultad añadida es el hecho de la gran variabilidad existente en la constitución de las bayas, entre las uvas de un racimo, entre los racimos de una misma cepa y entre las cepas de una parcela, siendo la metodología para el muestreo de las uvas de una importancia primordial ya que condiciona la aplicabilidad real de los resultados obtenidos posteriormente en el laboratorio.

Por lo tanto, y en función de lo anteriormente expuesto, el control de calidad de la vendimia es en la actualidad, uno de los aspectos más importantes que deben ser tenidos en cuenta por los enólogos en la elaboración de los vinos, con objeto de obtener información precisa que pueda ser utilizada para evaluar la calidad de la uva, y así poder tomar decisiones en el proceso productivo. En la mayoría de las industrias vitivinícolas como ya se ha apuntado, esta caracterización se basa en controles visuales y a través de la realización de muestreos y análisis destructivos en el laboratorio.

Asimismo, es importante avanzar en metodologías que permitan realizar estos controles analíticos de forma instantánea y fiable, que posibiliten tomar decisiones rápidas durante el proceso productivo. En este sentido, el sector vitivinícola demanda la existencia de tecnologías fiables, sencillas, rápidas y baratas para evaluar objetivamente la calidad de la materia prima. Según Martínez de Toda (2011) sería muy interesante, para el sector vitivinícola, evaluar la calidad de la uva a través de un método rápido y fiable, que permitiera clasificar las uvas para llevar a cabo una elaboración separada por calidades; un método riguroso y objetivo que fomentara el concepto de calidad de uva y vino entre los viticultores y el sector elaborador. Además, permitiría establecer un sistema transparente y objetivo para fijar el precio de la uva.

### 3.3.1. El material vegetal

Para obtener uva de la más alta calidad es imprescindible que la variedad cultivada tenga unas condiciones cualitativas mínimas y esté suficientemente adaptada a las condiciones de cultivo concretas. En general puede considerarse como una “variedad de calidad reconocida” aquella que está autorizada para su cultivo en la región o Denominación de Origen concreta (Martínez de Toda, 2011).

Las distintas variedades de uva no se comportan del mismo modo durante la maduración, y los mostos obtenidos de cada una de ellas presentan acusadas diferencias en su composición. Así, existen variedades aromáticas que acumulan sustancias olorosas en los hollejos, comunicando a las uvas y al vino su aroma particular, mientras que las uvas de otras variedades no presentan esta peculiaridad. Sin embargo, desde el punto de vista enológico es la acidez y, particularmente, el ácido málico el compuesto mayoritario más variable de una variedad a otra (Moreno y Peinado, 2010).

Las variedades tradicionalmente autorizadas en el Reglamento de la D.O. Montilla-Moriles han sido: *Pedro Ximénez*, *Lairén*, *Baladí*, *Moscatel de Grano Pequeño* y *Torrontés*, siendo la variedad *Pedro Ximénez* la considerada como principal, al ocupar el 95% de la superficie vitícola de la D.O.; al resto de variedades se suele denominar en la comarca con el término de “vidueño”, como nombre genérico de las variedades minoritarias.

En los últimos años acogándose a las ayudas para la reestructuración y reconversión del viñedo reguladas por la Orden de 19 de Octubre del 2000 de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía (BOJA nº 123, de 26 de Octubre de 2000) se han plantado otras variedades blancas tales como *Macabeo* (63,8 ha), *Chardonnay* (22,7 ha), *Moscatel de Alejandría* (17,1 ha), *Verdejo* (6,2 ha) y *Sauvignon Blanc* (5,2 ha) (Consejería de Agricultura y Pesca, 2011, datos no publicados). Estas variedades no estaban amparadas por el Reglamento de la D.O. (BOJA nº 125, de 31 de diciembre de 1985), pero fue aprobada su inclusión en el mismo como variedades autorizadas en el Pleno del Consejo de diciembre de 2008 y se realizó la propuesta de esta modificación a la Consejería de Agricultura y Pesca en abril

de 2009. En el nuevo Pliego de Condiciones de la D.O. estas variedades aparecen ya como autorizadas.

También se han plantando variedades tintas principalmente: *Syrah* (317,3 ha) *Tempranillo* (151,9 ha), *Merlot* (78,2 ha) y *Cabernet Sauvignon* (74,4 ha) (Consejería de Agricultura y Pesca, 2011, datos no publicados). La elaboración de vinos tintos en Montilla-Moriles se contempla como una importante línea de diversificación de los productos de la zona, aunque actualmente no están acogidos dentro de la Denominación de Origen, sí que están amparados por la mención Vinos de la Tierra de Córdoba (BOJA nº 249, de 22 de diciembre de 2011).

Desde 2008 a 2010, en las nuevas plantaciones que se están realizando se está implantando la variedad *Pedro Ximénez* casi de forma exclusiva, de tal forma que en estos tres años se han plantado 681,9 ha en el Sur de Córdoba de esta vinífera (Consejería de Agricultura y Pesca, 2011, datos no publicados).

### **3.3.2. Factores precosecha**

#### *3.3.2.1. El suelo*

El suelo vitícola resulta de la modificación del suelo natural por las técnicas de cultivo tendentes a obtener un crecimiento óptimo y una calidad superior del producto, elegida en función de criterios ecológicos, geográficos, y económicos, siendo considerado capaz de permitir el crecimiento y desarrollo normal de la vid (Hidalgo, 2002).

El sustrato geológico se expresa en la calidad diferenciada de los vinos, pero esta expresión solo es posible si se sabe mantener un suelo vivo, con un contenido microbiano abundante y equilibrado, y se opta por técnicas y prácticas culturales adaptadas a estas exigencias. Parece claro que la roca madre originaria, vinculada al origen geológico, debe ejercer algunos efectos sobre el vino. Esta roca madre contiene los minerales que, al alterarse, van a dar los elementos constitutivos del suelo y determina la proporción en que éstos se encuentren. Entre ellos resultan particularmente

relevantes los oligoelementos. Cada oligoelemento presente en el suelo desarrolla un papel de cofactor enzimático en la síntesis de las moléculas complejas que produce la viña y que son las precursoras de los aromas del vino. De este modo, la composición de cada roca madre determina la naturaleza y proporción en que estas moléculas se van a formar, esto es, el complejo aromático personalizado de cada *terroir* (Hernández, 2005).

Realmente se producen vinos en tipos muy variados de terreno, con diversos perfiles pedológicos, estructuras, profundidades, componentes químicos, pH, etc., siempre que no tengan extremadas condiciones adversas, como suelos salinos, muy clorosantes, muy húmedos, excesivamente secos, rocosos, etc. Precisamente su diversidad es uno de los mayores atractivos que presentan para la producción vitivinícola (Hidalgo, 2002).

Las parcelas deben de reunir una serie de condiciones de suelo para evitar inducir un desarrollo vegetativo excesivo, unos niveles nutricionales y de materia orgánica muy altos (>3%), y una alta y constante presencia de agua en la planta (capas freáticas, humedales, presencia de canalizaciones de agua con filtraciones intensas, etc.). En cualquier caso, un vigor excesivo va en detrimento de la calidad de la uva, favorece el riesgo de enfermedades y aumenta el uso de tratamientos fitosanitarios (Generalitat de Catalunya, 2010).

El suelo muy fértil provoca un crecimiento excesivo y, lo que es peor, prolongado incluso durante el período de maduración de la baya por lo que se retrasa el envero y la maduración no es adecuada. Además, van a existir más problemas de sombra debidos a la mayor densidad foliar y frondosidad de la vegetación y más enfermedades criptogámicas repercutiendo todo ello en una vendimia de menor calidad. El suelo poco fértil se va a comportar de forma totalmente inversa, limitando el crecimiento del pámpano y favoreciendo la obtención de una cosecha de calidad. Estas diferencias de comportamiento en función de la fertilidad del suelo tienen más influencia sobre la calidad en climas frescos que en climas cálidos, pero aún en estos últimos siguen siendo significativas. Los mejores suelos son generalmente en pendiente, poco profundos, bien drenados, con fertilidad moderada, que inducen en el viñedo vigor moderado, parada precoz de la vegetación, producción moderada y buena maduración (Martínez de Toda, 2011).

### 3.3.2.2. El clima

Dentro de los factores permanentes de la producción vitícola, el clima es posiblemente el que con mayor intensidad determina las posibilidades y la vocación vitícola del medio, en relación con las exigencias de las variedades de vid cultivadas y los destinos de producción. La vid tiene unas exigencias climáticas bien determinadas, definidas fundamentalmente por las temperaturas, la insolación y las lluvias teniendo también una influencia decisiva los mesoclimas y los microclimas (Hidalgo, 2002).

El carácter de la añada está particularmente afectado por el microclima de una determinada región condicionado por las condiciones geo-edafo-climáticas de una determinada zona (Moreno y Peinado, 2010).

Para cada variedad existen unas condiciones térmicas ideales en las que se obtienen los mejores resultados, pero no se puede excluir ninguna zona por lo menos entre 1.000 y 2.400° C, según Índice de Winkler (1944), lo que engloba, en general, a cualquier zona vitícola. En cualquiera de esas zonas se puede producir uva de “alta calidad”, sobre todo si la variedad cultivada está bien adaptada a esas condiciones térmicas, otra cosa es que las características de la uva producida sean distintas a las obtenidas en otra zona, pero ambas pueden ser de “alta calidad”. Existen suficientes experiencias que demuestran la influencia positiva del salto térmico (diferencia entre temperaturas diurnas y nocturnas) durante el período de maduración sobre la síntesis de antocianos, compuestos que inciden decisivamente en la calidad de los vinos tintos. Este salto térmico es superior en las situaciones en que la temperatura media en la época de vendimia es inferior a 15°C, pues es la temperatura mínima (nocturna) la que reduce el valor de la temperatura media; por eso en la situación más fresca ( $T^a < 15^\circ\text{C}$ ) se indica una mayor síntesis de antocianos (Martínez de Toda, 2011).

La amplitud del ciclo vegetativo, hasta 220 días, con temperaturas superiores a los 10°C de media, parece, en principio un criterio positivo; sin embargo, los terrenos marginales con heladas primaverales, logran las mejores calidades, acaso por la simple razón de actuar la helada como una poda drástica en verde y permitir toda su fuerza

vegetativa y madurativa sobre los racimos. Igualmente resulta evidente que la coincidencia difícil de un periodo en invierno húmedo, con unos 20 litros por metro cuadrado de lluvia después de veinte días previos secos y seguido de otro período igual, consolida una maduración de grano pequeño que es trascendente para el vino tinto de calidad (Ruiz, 2001).

En climas fríos se buscan variedades precoces que maduran rápidamente antes de los fríos de otoño y que necesitan poco calor desde la entrada en actividad hasta la madurez, proporcionando frutos poco ácidos. En estos climas es más difícil conseguir uvas con una acidez equilibrada y un color suficiente, que un contenido en azúcar adecuado para elaborar un vino correcto. Por ello, se cultivan sobre todo variedades blancas, ya que las tintas necesitan climas soleados para la síntesis de antocianos y taninos. En regiones de climas cálidos se cultivan cepas tardías, de tercera o cuarta época, con las que se pueden obtener rendimientos elevados en azúcares o en peso de cosecha, mientras que en climas templados se utilizan variedades de primera o segunda época (Moreno y Peinado, 2010).

Se puede afirmar que cuanto más largo sea el periodo de maduración más azúcar almacenarán los granos y mejor será la calidad de la cosecha. Las vendimias prematuras originadas por circunstancias adversas, como fríos y lluvias, que corrientemente provocan el rajado en el grano y acarrear podredumbre, deben considerarse como un mal menor frente a la bajada de calidad del producto (Hidalgo, 2002).

### **3.3.3. Factores humanos: Técnicas de cultivo**

#### *3.3.3.1. La poda*

La base fisiológica fundamental de la calidad en un viñedo radica en la interceptación de la radiación solar con el conjunto de la vegetación; de este aspecto se ocupa la ecofisiología vitícola. El objetivo general ha de ser el de maximizar la captación de energía solar y favorecer un reparto homogéneo en el conjunto de la vegetación. Una deficiente exposición de la vegetación a la radiación solar disminuye el contenido en azúcares, polifenoles, antocianos, aromas y acidez total y aumenta el pH, ácido málico, contenido en potasio y el carácter herbáceo, quedando patente la



influencia negativa del exceso de vegetación en el viñedo para una producción de uva de calidad (Martínez de Toda, 2011).

La relación entre la superficie foliar expuesta (y sana) y la producción de uva ha de ser superior a 1,1 m<sup>2</sup>/kg en los tipos de conducción con vegetación libre (como el vaso y el cordón libre) y superior a 1,3 m<sup>2</sup>/kg en los tipos de conducción con vegetación dirigida (como la espaldera clásica) (Martínez de Toda, 2008).

La poda regula la forma y la carga de la cepa. Se debe efectuar tras la caída de la hoja. La forma en que se realice influye sobre la producción de la planta en el ciclo vegetativo siguiente (Moreno y Peinado, 2010).

Las labores de poda en verde, se llevan a cabo cuando la viña está en plena vegetación entre los estados fenológicos G y H de Baggioolini (Baggioolini, 1952). Estas, tienen por finalidad corregir posibles errores de poda, eliminar brotes inservibles, favorecer el equilibrio vegetativo, facilitar la aireación de la copa para mejorar la fecundación de los racimos y disminuir los ataques de enfermedades, y aumentar la eficacia de los tratamientos. Es una operación muy importante, imprescindible en viñas jóvenes, que no está muy extendida debido a su coste elevado (Reynier, 2002).

Mediante el despuntado se eliminan las extremidades de las ramas en crecimiento, permitiendo un mayor aporte de sustancias al fruto que madura, aunque estudios realizados ponen de manifiesto que la mayor diferencia en cuanto a composición entre las uvas de una cepa despuntada y otra cepa no despuntada estriba en el mayor contenido de aquellas en ácido málico. El menor contenido en uvas de cepas no despuntadas es debido a una mayor combustión respiratoria de este ácido en las hojas (Moreno y Peinado, 2010).

Con el deshojado que se realiza a veces en la época de maduración, se pretende que la uva alcance más rápidamente la madurez y evitar ataques de hongos o podredumbres. Sin embargo, esta práctica perjudica al rendimiento y a la calidad si se realiza durante la maduración debido a la reducción de la superficie de fotosíntesis. Únicamente se puede aconsejar al deshojado pocos días antes de realizar las vendimias,

y sobre las hojas de la base de los sarmientos, que son en este período cada vez menos activas. Se efectúa pues, prácticamente con el único fin de evitar la podredumbre aireando los racimos, o para alcanzar la maduración de las uvas por exposición de estas al sol, o para obtener una cierta sobremaduración, o incluso para facilitar la recolección (Moreno y Peinado, 2010).

Por todas las razones anteriormente expuestas es necesario realizar la poda sobre la planta, ya que con ello se conseguirá dar a la planta en sus primeros años una forma determinada, y más adelante conservársela para facilitar todas las operaciones de cultivo, haciendo con ello que la explotación de la vid sea económica. Además con una poda adecuada se conseguirá una cosecha anual lo más regular y constante posible, junto con una regulación de la fructificación, haciendo que los racimos aumenten de tamaño, mejoren la calidad y maduren bien. Con la poda además se consigue acomodar las dimensiones de la planta y limitar su potencial vegetativo, armonizándolo con el modo de ser de la variedad explotada y las posibilidades que le ofrece el medio en el que vive, para colocarla en las mejores condiciones de insolación y aireamiento, favoreciendo sus funciones capitales, como la fotosíntesis, y evitando accidentes y enfermedades (Hidalgo, 2002).

### *3.3.3.2. El riego y el abonado*

El abonado y el riego al igual que la fertilidad del suelo, aumentan el crecimiento, el vigor, la superficie total y la producción, por lo que han de ser moderados. Un abonado intensivo tiene como resultado la disminución de color de los vinos tintos; los vinos obtenidos de parcelas abonadas son también menos tánicos, con menos cuerpo (Martínez de Toda, 2008).

El riego presenta el dilema de tener que escoger entre producción y calidad; un estrés moderado reduce el rendimiento del cultivo pero puede mejorar algunos atributos de calidad de la fruta; y sin estrés de agua, se puede aumentar el rendimiento pero puede reducirse la calidad poscosecha (Crisosto y Mitchell, 2007).

A partir del envero y hasta el momento de la vendimia la falta de agua puede producir el agostamiento y la caída de las hojas inferiores, lo que deja sin protección los

racimos que pueden sufrir quemaduras por exposición al sol. Un estrés hídrico durante esta fase puede dar lugar a una pérdida de acidez y a un aumento del pH, así como a una reducción de la cantidad de azúcares de las uvas. Al final del período de maduración no conviene regar porque un exceso de agua puede producir rotura de granos y dilución de los diferentes componentes de las bayas (López et al., 2007).

### 3.4. LA MADURACIÓN

La maduración se define como el periodo comprendido entre el envero de la uva y la vendimia. Este período tiene una duración media de 46 días durante el cual la uva continúa engordando (Blouin y Guimberteau, 2004).

La maduración es un complejo proceso que engloba fenómenos tales como el enriquecimiento en azúcares, pérdida de acidez, ablandamiento de la piel, coloración de la piel, formación de taninos, formación de aromas. Cada variedad llega a este proceso con una evolución característica de cada uno de estos parámetros según sus condicionamientos: climatología y características del viñedo (suelo, carácter genético y técnicas de cultivo). Por lo tanto es necesario realizar estudios de maduración siguiendo la evolución de los componentes de la uva (Ruiz, 2001).

La evolución de la maduración en ocasiones puede dar una idea anticipada de la calidad potencial de la vendimia, especialmente cuando se desarrolla en malas condiciones ecofisiológicas: defoliación precoz (oscurecimiento, *mildiu*, granizo), cosecha importante, fuerte vigor con abundante vegetación, etc. Un primer índice de vendimia depreciada se puede obtener de la observación de un envero muy lento, irregular sobre la cepa y sobre el racimo; cuando se obtiene un racimo rosa violáceo se constata que las bayas situadas al centro de la cepa están todavía verdes. En general, la precocidad permitida por un clima benigno o por una fitotecnia particularmente cuidada conduce a una vendimia de alta calidad, mientras que una maduración tardía de origen climático (ligada a una insuficiencia térmica o de insolación, un exceso de lluvia o una sequía intensa) o como consecuencia de una fitotecnia descuidada, es siempre nefasta para la calidad (Flanzy, 2003).

La maduración en el racimo no es homogénea, ya que en la zona superior la maduración siempre está más adelantada que en su zona terminal (Hidalgo, 2006). El examen visual de los racimos hasta el momento de la vendimia, permite afirmar que el color de las bayas cambia mucho en función de su situación en la planta, en el racimo, etc. Dicha variabilidad muestra las importantes diferencias que existen entre la cara soleada del racimo y la que permanece en la sombra, lo que se ve directamente condicionado por la orientación del mismo (Blouin y Guimberteau, 2004).

El proceso de maduración ejerce un gran efecto sobre las moléculas responsables del color y los taninos, que condicionan de forma definitiva la calidad del vino. La concentración de estas sustancias aumenta durante la maduración hasta alcanzar un punto máximo después del cual disminuye ligeramente (Zamora, 2003).

#### **3.4.1. Seguimiento de maduración**

El estado de madurez de la uva condiciona totalmente el vino que se quiere obtener y sus características. Por ello es necesario realizar estudios de maduración, con el fin de planificar la vendimia.

Es fundamental para la identificación del momento óptimo de vendimia realizar el seguimiento de la maduración, el cual se basa en la recogida periódica de muestras y en el análisis posterior de los resultados.

El seguimiento de la maduración de las uvas es un método racional y fiable, que garantiza una fijación juiciosa de la fecha de vendimia, a la vez que permite conocer de antemano su composición y por tanto, favorece la elección con la suficiente antelación del método de vinificación más adecuado (Moreno y Peinado, 2010).

Se han realizado numerosas experiencias demostrando la importancia del seguimiento de maduración para proceder a la recolección de la uva. Según un estudio realizado por Denteil (1998) los vinos elaborados con una vendimia más tardía obtuvieron una mejor puntuación en el análisis sensorial que aquellos elaborados con vendimias más tempranas.

### 3.4.2. La toma de muestras

En la toma de las muestras de uva el fin primordial es la obtención de una muestra representativa del estado de madurez real de la uva. La realización de una toma de muestras correcta tiene una importancia fundamental, ya que es esa muestra de uva trasladada al laboratorio la que nos indicará el comportamiento de la viña.

La forma de realizar el muestreo es esencial y debe cumplir una serie de requisitos (Pérez y Morales, 1998):

1. Es preciso dividir cuidadosamente la zona vitícola a controlar en unidades homogéneas de cultivo, donde se suponga que su producción resultará homogénea a lo largo de los años. Se agruparán los viñedos o parcelas con la misma variedad y clon de cultivo, también los que posean un terreno de similares características, con microclimas parecidos y con los mismos sistemas de conducción. El análisis de las submuestras se realizará independientemente. Los resultados obtenidos ayudarán a organizar la vendimia.
2. El recorrido para la toma de muestras debe realizarse siguiendo la dirección de mayor longitud.
3. La muestra de uva debe tomarse de cepas que presenten un comportamiento normal dentro de la parcela (o subparcela) considerada. Deben de descartarse las extremas (excesivamente vigorosas o débiles) y las enfermas.
4. Se seleccionará un número de cepas repartidas por la parcela, proporcional a su extensión, cuidando de que sean las más representativas.
5. De dichas cepas, cuando las características externas del racimo lo indiquen (aproximadamente después del envero medio), se dará comienzo a la toma de muestras periódicas, al principio en intervalos de tiempo largo (7 días) y en intervalos de tiempo cortos (cada día) cuando se acerca la maduración.
6. El número de racimos por muestra deberá establecerlo la persona que realice el muestreo en base a parámetros de tamaño de la parcela, grado de heterogeneidad de las cepas, experiencia, etc. Los resultados están más determinados por la forma de tomar la muestra que por el tamaño de la misma, dentro del intervalo anterior.

7. Se realizará una selección de racimos de la parte alta, media y baja de la cepa y de aquellos que estén situados al sol y a la sombra alternándose la parte interna y externa del racimo.

### **3.4.3. Determinación de la fecha de vendimia**

Tradicionalmente la fecha de la vendimia se establecía según la experiencia y costumbre de muchísimas vendimias realizadas en la zona vitícola; no siendo este dato en absoluto desdeñable, pero para alcanzar ciertos niveles de calidad y de control en los procesos de elaboración, es preciso establecer una sistemática para estimar la maduración (Hidalgo, 2006).

La elección de la fecha de vendimia no debe ser empírica, no debe basarse únicamente en la apariencia de la uva, en su consistencia, su acidez a la boca o el color de las partes leñosas, sino que debe estar basada en el seguimiento del proceso de maduración mediante la medida precisa de determinados constituyentes de la uva. Los principales factores que deben considerarse para fijar la fecha de vendimia son: el tipo de vino a elaborar (joven, de guarda, licoroso etc.), el estado sanitario de la uva (puede condicionar la recogida prematura) y las condiciones meteorológicas durante la época de vendimia (Moreno y Peinado, 2010).

El momento óptimo de madurez para obtener tintos jóvenes, corresponde al equilibrio de los principales componentes. El momento de máximo contenido en aromas y acidez es el óptimo para vinos blancos jóvenes y rosados. Para vinos de guarda el momento óptimo está determinado por una adecuada composición en polifenoles (Martínez et al., 2001).

Las fechas óptimas de vendimia para las elaboraciones más habituales recomendadas por Pérez y Morales (1998) son:

- Vinos blancos destinados a la elaboración de vinos generosos (finos, manzanillas, amontillados, olorosos, palos cortados, etc.). Debido a la propia naturaleza de la elaboración lo ideal es recolectar la uva con el

máximo de azúcares, aún a riesgo de perder peso y acidez por efecto de la sobremaduración.

- Vinos blancos jóvenes: La situación óptima sería recoger la variedad en el momento de la madurez fisiológica o inmediatamente anterior, evitando todo efecto de sobremaduración, y con una acidez aproximada del mosto de 8 g/l expresados en ácido tartárico. La mayoría de las variedades cultivadas tradicionalmente en las zonas cálidas de Andalucía, no son por sus propias características varietales las idóneas para este fin. Se recolectan sin alcanzar el estado de madurez fisiológica ya que ello llevaría a un descenso importante de la acidez y a un exceso del grado alcohólico potencial de los vinos. Para estas variedades no debería sobrepasarse los 10-10,5° de alcohol probables en el mosto (1,075-1,080 g/cm<sup>3</sup> ó 10-10,5° Be), que se corresponderá con una acidez aproximada sobre 5 g/l en ácido tartárico.

Como resumen los autores proponen de forma genérica, y en función de las características de la uva, que podría elaborarse un vino joven con contenidos en sólidos solubles en el intervalo 1,075-1,090 g/cm<sup>3</sup> (10-11,5° Be; 10-12,5° alcohol probable) y con una acidez en el mosto de 5 a 8 g/l expresados en ácido tartárico.

- Vinos tintos jóvenes: en esta elaboración hay que evitar una acusada sensación tánica y herbácea en el vino. Ello se consigue en gran medida ajustando lo más posible el momento de la recolección a la madurez fenólica que se define como la madurez óptima para la elaboración de vinos tintos de alta calidad, se necesita cierta sobremaduración de la pulpa para alcanzar una correcta maduración de pieles y semillas y mayor acumulación de las moléculas responsables del color. Tanto el color como su estabilidad así como las características relacionadas con la estructura y la astringencia de un vino se fundamenta sobre su composición en compuestos fenólicos. Se puede constatar que al retrasar la vendimia, y por tanto aumentar el nivel de madurez de la uva, se produce un incremento de la sensación de volumen en boca y de la sensación de tanicidad. Por el contrario disminuye la acidez, la astringencia y el sabor amargo. Durante las últimas fases del proceso de

maduración, además de producirse una acumulación de azúcares y una síntesis activa de compuestos fenólicos, se producen también ciertos cambios que influyen enormemente en la calidad del vino, desde el punto de vista sensorial las diferencias son notablemente mas favorables (Zamora, 2003).

Los autores proponen como momento de vendimia para vinos tintos jóvenes un contenido en sólidos solubles de 1,090-1,095 g/cm<sup>3</sup> (11,6-12,1° Be; 12-12,5° alcohol probable) y una acidez del mosto de 6 a 7 g/l expresados en ácido tartárico. El índice de polifenoles totales en tinto joven de calidad debe estar comprendido entre 35-40.

- Vinos de crianza: lo que se persigue principalmente es una buena composición y proporción en polifenoles. Para ser destinado a crianza un vino debería poseer como mínimo un índice de polifenoles totales por encima de 60, de lo contrario no será prudente destinarlo a la crianza, ya que probablemente se oxide y al final del proceso habrá perdido gran parte de su color. Además de un buen contenido en polifenoles los vinos destinados a crianza deben ser vinos con un contenido alcohólico elevado y un pH bajo (menor de 3,50 unidades).

### **3.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS TRADICIONALES DE DETERMINACIÓN DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DE CALIDAD EN UVAS**

La mayoría de las determinaciones analíticas oficiales descritas a continuación requieren la realización de una serie de etapas en su desarrollo: preparación de muestra, dilución, valoración, medidas instrumentales, etc.

A continuación, se describen los principales parámetros usados para evaluar la calidad de las uvas y los métodos analíticos tradicionales empleados.

#### **3.5.1. Contenido en sólidos solubles totales**

Los sólidos solubles de uvas, constituyen el conjunto de sustancias presentes, diferentes al agua, que se encuentran disueltas en la fase líquida.



El contenido en sólidos solubles de la uva proporciona una medida del grado de madurez del fruto y es un método aproximado para conocer su concentración en azúcares y estimar el contenido alcohólico probable del vino (fecha óptima de vendimia). A partir del inicio de la maduración, aproximadamente el 90% de los sólidos solubles está compuesto por azúcares fermentables. En los estados de desarrollo anteriores (uva verde y envero), tienen una mayor representación las formas ácidas (ácidos D-tartárico y L-málico, fundamentalmente), debido a sus elevadas concentraciones en esos estados fisiológicos (Ribéreau-Gayon et al., 1980).

El contenido en sólidos solubles totales de uvas se expresa con diferente terminología según el método de determinación y las unidades que se utilicen para expresar los resultados. Entre estos métodos se encuentran los grados Brix.

Los grados Brix o Balling (% m/m sacarosa) indican los gramos de sacarosa por 100 gramos de mosto. Es decir, un mosto con 180 gramos de azúcares por kilo de mosto tiene 18 Brix. El método oficial de análisis se basa en la refractometría y está publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE, 2005).

### **3.5.2. Azúcares reductores**

Los azúcares reductores son el conjunto de las sustancias de naturaleza glucídica presentes en la uva, que muestran un efecto reductor sobre una disolución alcalina de cobre (II) por los grupos, aldehídico o cetónico, que dichas sustancias químicas poseen.

El conocimiento del contenido de azúcares reductores en la uva permite valorar el estado de madurez de la fruta y estimar la fecha óptima de vendimia en función del tipo de vino que se va a elaborar.

El 99% de los azúcares reductores presentes en la uva corresponden a la glucosa y la fructosa, moléculas constituidas por seis átomos de carbono (hexosas) y que son fácilmente consumidas por levaduras y bacterias.

El procedimiento tradicional para la determinación de azúcares reductores es el establecido por Rebelein (1971). El límite del método es 25 g/l, por lo que es necesario diluir las muestras en caso de que su concentración sea superior.

### **3.5.3. Acidez titulable y pH**

La evolución de la acidez titulable y del pH durante la maduración de la uva se puede utilizar, junto con los azúcares, como índices de madurez para determinar la fecha óptima de vendimia.

La acidez de la uva se debe fundamentalmente a los ácidos orgánicos presentes, ya que los minerales se hallan totalmente salificados. Los ácidos orgánicos presentes más importantes son el tartárico, el málico y el cítrico; y cada uno de ellos tiene un comportamiento propio durante la maduración de la uva.

La acidez titulable es la suma de todos los ácidos presentes en la muestra cuando se titula con hidróxido sódico 0,1 N hasta pH 7.

El pH de un mosto o vino constituye una medida de los protones cedidos al agua por parte de las especies con actividad ácida en la muestra. Viene determinado por la fuerza de los ácidos presentes y su valor depende más del tipo de ácido que de la concentración. Los valores adecuados de pH para el mosto y el vino están comprendidos entre 3,4 y 3,5; valores inferiores indicarían excesiva acidez, y valores superiores a 3,6 harían necesario realizar una corrección para disminuir el pH.

La determinación del pH y de la acidez titulable se realiza de forma tradicional por el método oficial de análisis (DOUE, 2005).

### **3.5.4. Ácido tartárico**

En general, la mitad o más de la acidez titulable de la uva se debe al ácido tartárico y a sus sales ácidas. Éste es el ácido orgánico más fuerte de los presentes en la uva. Es un ácido diprótico, que se encuentra en la uva en forma de ácido sin disociar, o

parcialmente disociado formando el ion bitartrato, o totalmente disociado como ion tartrato.

Se tiende a considerar la concentración del ácido tartárico durante la maduración como bastante constante. En líneas generales esto es válido la mayoría de los años cuando sólo se contemplan los valores iniciales y finales del período de maduración. Pero no lo es tanto cuando se hace un seguimiento más profundo de la maduración. En realidad la concentración de este ácido sufre fluctuaciones continuas, debido a los fenómenos de migración, síntesis y combustión relacionadas con las condiciones exteriores (Peynaud, 1996).

Su determinación se realiza mediante el método Rebelein (Rebelein, 1969), siendo el resultado expresado en g/l.

### **3.5.5. Ácido málico**

Es un ácido con presencia general en las frutas aunque su nombre deriva de la manzana. Se degrada al madurar la uva por combustión respiratoria, pero a su vez puede constituir un escalón intermedio en la maduración para la formación de los glúcidos. Se estima que disminuye en las uvas al madurar, teniendo esta caída una pendiente diferente según las variedades (Ruiz, 2001).

El ácido málico es el ácido mayoritario en el reino vegetal, sin embargo en la uva madura es el segundo en importancia después del ácido tartárico. La uva verde tiene cantidades significativas de este ácido, pero durante el proceso de maduración del fruto se produce una degradación importante del mismo debido principalmente a procesos de combustión (López et al., 2009).

El ácido málico es el responsable del verdor en los vinos. El sabor málico en un vino es desagradable, pero la existencia de dicho ácido es saludable por cuanto supone una posibilidad de transformarse en ácido láctico el cual es un factor definido de calidad para vinos de mesa (Ruiz, 2001).

Tradicionalmente se determina mediante el método enzimático (MAPA, 1993), siendo el resultado expresado en g/l.

### **3.5.6. Potasio**

El potasio es el catión que se encuentra en una concentración más elevada en la uva. Su contenido depende de la variedad, las condiciones edafoclimáticas y la época de vendimia entre otros factores.

Las cantidades en uva oscilan desde 1,5 a 3 g/kg. Este catión absorbido por la raíz neutraliza parte del anión tartárico y de este modo regula el pH y, en consecuencia, los procesos generales afectados por la acidez real del mosto y vino. Las variedades difieren en su posibilidad de captar potasio del suelo. El suelo facilita la nutrición a partir de la potasa de abonos, sin embargo los suelos arcillosos ralentizan su paso a la raíz (Ruiz, 2001).

El potasio en maduración sigue un curso ascendente suave, hasta una semana antes de la vendimia en que inicia un incremento importante. La fase final de maduración próxima al agostado, supone una succión de potasio hacia la baya, salificándose una fuerte proporción de tartárico. Durante el proceso madurativo el potasio tiende a acumularse en el hollejo. Esto es patente en viníferas potasiófilas tales como *Tempranillo* y *Cabernet Sauvignon* (Ruiz, 2001).

La determinación tradicional se realiza mediante fotometría de llama según el método oficial establecido por el MAPA (1993), siendo el resultado expresado en mg/l.

## **3.6. LA TECNOLOGÍA DE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS)**

La demanda de altos niveles de calidad y seguridad en la producción de alimentos, requiere obviamente un alto nivel de garantía de calidad y control de procesos; la satisfacción de dicha demanda, a su vez precisa de herramientas analíticas apropiadas para análisis de alimentos, tanto durante como después de la producción. Las características inherentes de estas herramientas incluyen la velocidad, facilidad de uso,

mínima o ninguna preparación de la muestra, evitando además la destrucción de la muestra. Estas características son implícitas a la espectroscopía NIRS (Woodcock et al., 2008; Karoui et al., 2010).

La espectroscopía NIR, que se presenta como una metodología alternativa a los análisis tradicionales de laboratorio, ha obtenido la aprobación de la industria enológica (Cozzolino et al., 2003; Liu et al., 2008) y de otros sectores agroindustriales (Osborne et al., 1993; Thyholt e Isaksson, 1997; Williams y Norris, 2001; Cen y He, 2007; Sánchez y Pérez-Marín, 2011). Esta tecnología además puede ser aplicada directamente en campo y en las líneas de producción, proporcionando datos en tiempo real (Williams y Norris, 1987; Katayama et al., 1996; Caprara y Pezzi, 2010).

Además, esta tecnología presenta otras muchas ventajas adicionales, que la hacen aún más atractiva, y que se enumeran a continuación: es respetuosa con el medioambiente, ya que no es necesario emplear ningún tipo de reactivo, con lo cual el problema de eliminación de los residuos analíticos que tienen los métodos químicos tradicionales también desaparece; posibilita analizar simultáneamente varios constituyentes para cada muestra; es flexible, pues puede ser utilizada en productos muy diversos; el coste operacional se reduce respecto a los métodos convencionales, y si bien el precio del instrumento es elevado puede considerarse una inversión recuperable a corto o medio plazo; es fácil de utilizar en rutina lo que permite que no sea necesario un entrenamiento específico para su uso; su aptitud para la incorporación a nivel de procesos y en la toma de decisiones (Williams y Sobering, 1992; Shenk y Westerhaus, 1995a; Garrido, 1997; Williams y Norris, 2001; Siesler, 2002; Roberts et al., 2004; Pérez-Marín et al., 2010, 2011; Sánchez et al., 2009, 2010, 2011, 2012).

La información espectral obtenida en la región NIR representa una "huella digital" única del producto analizado y, en el caso del sector frutícola se puede utilizar para simplificar los métodos y reducir los tiempos de análisis. Estas ventajas, junto con la capacidad de proporcionar información química detallada y medir simultáneamente varios analitos, han sido el impulso para el desarrollo de esta técnica espectroscópica (Cozzolino et al., 2007).

No obstante, la tecnología presenta una serie de desventajas. En su aplicación más tradicional, como la mayoría de las técnicas espectroscópicas, requiere ser calibrada con un método de referencia convencional para relacionar la información espectral con los parámetros cuantitativos o cualitativos de interés, aunque en algunos casos se puede hacer uso de la información espectral *per se* (Williams, 1991; Shenk y Westerhaus, 1995b). La problemática surge porque, generalmente, los métodos utilizados como referencia aportan información sobre las propiedades químicas y/o físicas del producto, mientras que la tecnología NIRS mide las vibraciones moleculares. A esto se une, en muchas ocasiones, la falta de definición y de repetibilidad de los métodos de laboratorio (Weyer, 1995; Shenk et al., 2001).

Una revisión exhaustiva de los fundamentos relativos a la tecnología NIRS nos alejaría de nuestros objetivos, por ello, únicamente se aborda de forma específica la revisión de aquellos aspectos científicos más estrechamente ligados a los objetivos y metodología de la presente Tesis Doctoral. No obstante, cabe destacar que en el momento actual existen varios libros y/o monografías que describen de forma detallada la historia y las bases científico-técnicas de la Espectroscopía NIR (Osborne et al., 1993; Burns y Ciurczak, 2001; Williams y Norris 2001, Siesler, 2002; Roberts et al., 2004; Sánchez y Pérez-Marín, 2011), los cuales han sido de gran utilidad a lo largo del periodo de investigación y, posteriormente, durante la redacción de esta memoria de Tesis Doctoral.

### **3.6.1. Bases teóricas**

La tecnología NIRS es una técnica espectroscópica que trabaja en la zona del espectro electromagnético del infrarrojo cercano. La gama de longitudes de onda nominal para el infrarrojo cercano (NIR) es de 780 a 2.500 nm ( $13.400$  a  $4.000$   $\text{cm}^{-1}$ ) (Osborne et al., 1993; Murray, 1999; McClure, 2003). Las muestras ya sean sólidas, líquidas o gaseosas, pueden absorber parte de la radiación incidente a longitudes de onda específicas dando como resultado una "huella digital" llamada espectro.

La espectroscopía NIR se define como una técnica espectroscópica vibracional molecular, al basarse en la absorción producida cuando la radiación proveniente del infrarrojo cercano vibra a la misma frecuencia específica que los enlaces moleculares

del producto analizado. Para que exista absorción de la luz incidente, la molécula debe experimentar un cambio en su momento bipolar como consecuencia de su vibración (Pavia et al., 2000).

La tecnología NIRS se basa en la emisión de un haz de luz sobre la muestra a analizar, la cual en función de su composición, o mejor aún, de la naturaleza de los enlaces presentes en sus moléculas, fundamentalmente de aquellos de tipo  $-CH$ ,  $-NH$  y  $-OH$ , interaccionará con ellos absorbiendo una determinada cantidad de radiación electromagnética en el rango del infrarrojo cercano, de 780 a 2500 nm (Shenk et al., 2001; Murray y Cowe, 2004). Es decir, la espectroscopía NIR se basa en información obtenida a partir de absorciones moleculares, como consecuencia de modificaciones de estados vibracionales energéticos cuando las moléculas interaccionan con la radiación.

Las vibraciones moleculares son el origen de las bandas de absorción fundamentales que se localizan en la región del infrarrojo medio. Sin embargo, en el infrarrojo cercano se localizan bandas de absorción que se corresponden con sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales (Miller, 2001; Benson, 2003). Los sobretonos y bandas de combinación aparecen a frecuencias más altas (por tanto, menores longitudes de onda) que las bandas fundamentales (Bertrand, 2001).

Normalmente, la interpretación de un espectro NIR es más compleja que su equivalente en la región del infrarrojo medio. Ello es consecuencia de que en la región NIR existen varias bandas de combinación y sobretonos para una misma molécula, lo que provoca la superposición de las mismas. Si bien, el solapamiento de las bandas de absorción en la región NIR puede resolverse mediante la aplicación de pre-tratamientos de la señal y análisis multivariante (Miller, 2001; Workman y Shenk, 2004).

Hay pocas bandas distintas de aquellas debidas a las moléculas CH, OH ó NH que puedan ser importantes en un espectro NIR de un producto agroalimentario (Osborne et al., 1993). No obstante, en productos tan complejos como un alimento, la asignación de bandas en la región NIR es muy compleja. La posición de la banda de absorción depende del ambiente tanto químico como físico que rodea al enlace

vibracional, es decir, factores como la temperatura, humedad, carácter cristalino o tamaño de las partículas que forman la muestra influyen en el espectro obtenido.

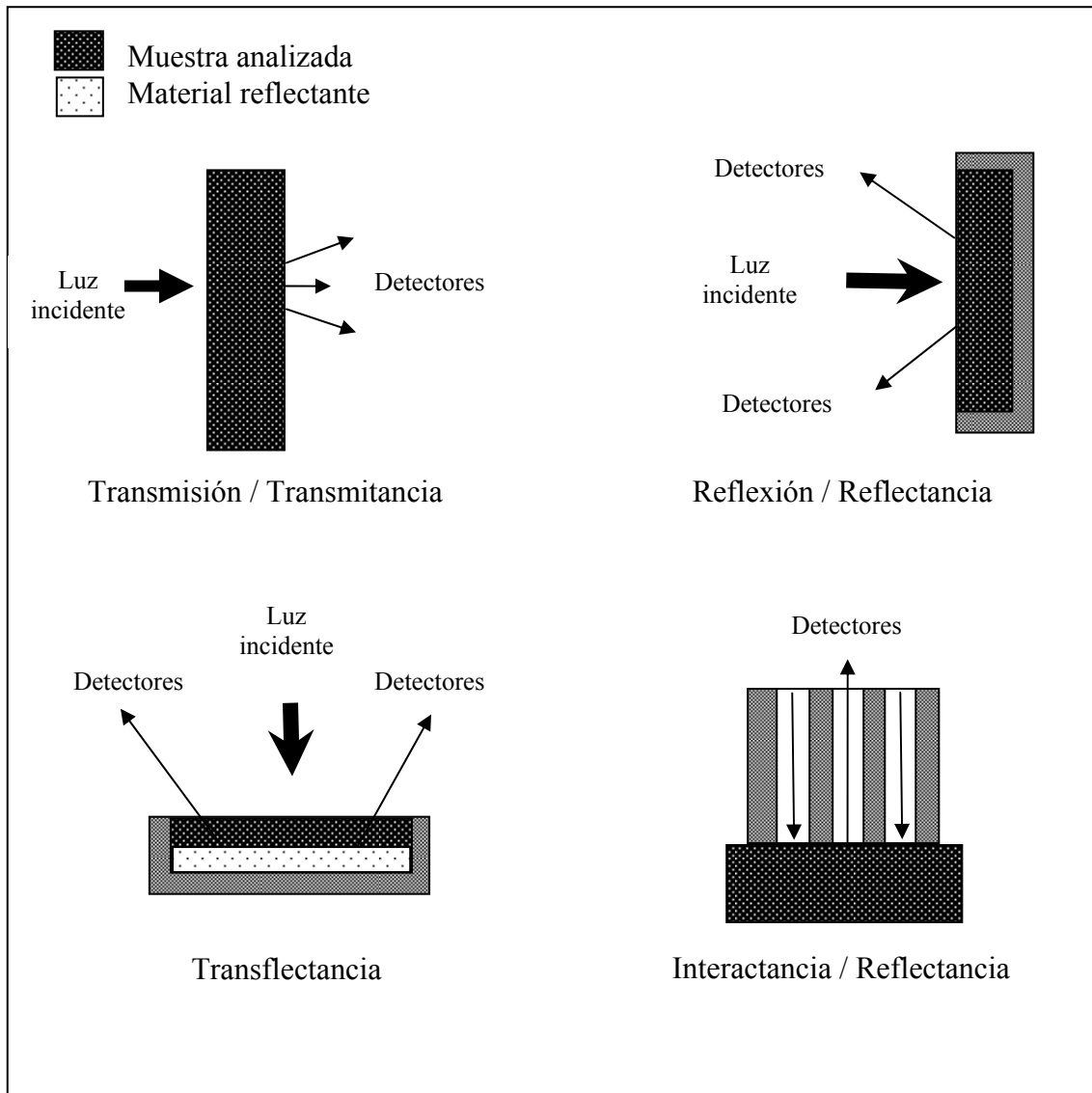
Existen distintos tipos de interacción de la luz monocromática producida por un instrumento NIRS con el material a analizar. Así, se pueden producir fenómenos de absorción, dependiendo del tipo de enlaces presentes en la muestra; de refracción, cuando la radiación sufra desviaciones en su dirección debido a los cambios en los índices de refracción de las diferentes partículas con las que interaccione; de transmisión, si la radiación atraviesa la muestra por los vacíos entre partículas o bien interaccionando con ellas; de reflexión o reflectancia, dentro de la cual se puede distinguir entre reflectancia especular, si la radiación incidente llega a la superficie y es reflejada sin opción a penetrar en el interior de la muestra, por lo que será difícil que contenga información relevante sobre la composición de la misma, y reflectancia difusa, es decir, la porción significativa de la luz incidente que tras interaccionar con las partículas, volverá a la superficie y será remitida, dependiendo fundamentalmente, de las cualidades dispersivas de la materia analizada que podrá ser descrita en términos de sus propiedades de remisión; y de difracción, refiriéndose a aquella parte de la luz incidente que interacciona con la muestra pero que en su movimiento a través de la misma en múltiples direcciones, no llega a ser reflejada y, por tanto, no alcanza los detectores (Dahm y Dahm, 2001; Shenk et al., 2001).

### **3.6.2 Bases instrumentales**

Los instrumentos NIRS permiten registrar el espectro, tanto de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. La versatilidad en cuanto al tipo de producto y atributo a medir es una de las características de la tecnología NIRS que se ha puesto anteriormente de manifiesto. La variabilidad en tipo de muestra y su presentación al instrumento conlleva que existan diferentes modos de análisis, en función de la naturaleza y tipo de producto analizado siendo uno más apropiados que otro.

La Figura 1 muestra los cuatro modos principales de análisis NIRS: transmitancia, reflectancia, transreflectancia, e interactancia (Kawano, 2002).





**Figura 1. Formas de análisis NIRS de los productos agroalimentarios (adaptado de Kawano, 2002)**

La ubicación de los detectores con respecto a la muestra determinará si el equipo trabaja en transmitancia, reflectancia, o combinaciones de éstas (Shenk y Westerhaus, 1995a).

En el caso de la transmisión, la luz incidente ilumina uno de los lados de la muestra, y la luz transmitida a través de la misma es recogida por los detectores situados en el lado opuesto. En el caso de la reflexión, más conocida como reflectancia, la luz incidente ilumina la superficie de la muestra, la cual debe ser opaca, y los detectores recogen la reflectancia difusa procedente de la muestra. La transflectancia, por su parte, combina los dos modos anteriores. Así, la luz incidente es transmitida a través de la

---

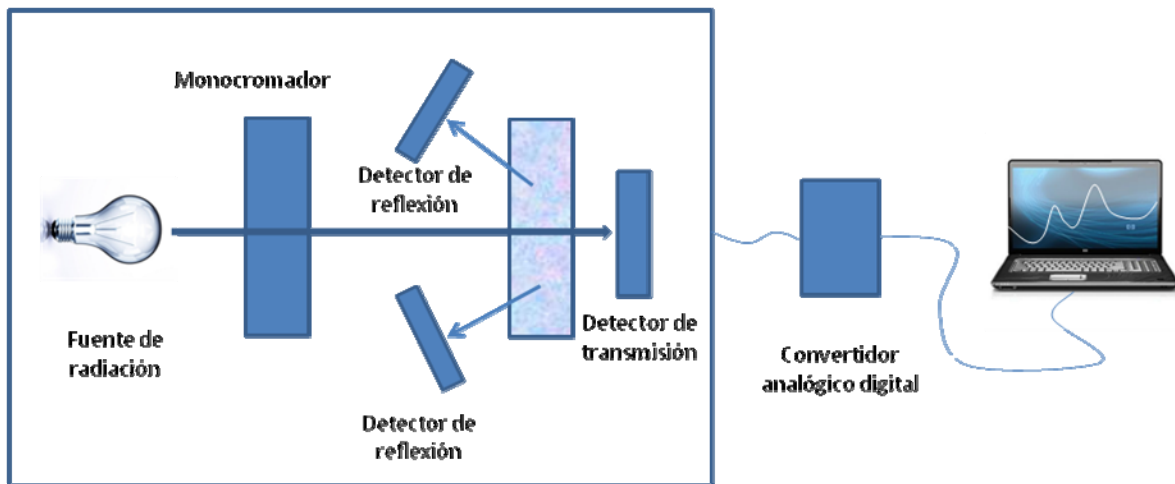
muestra hasta una superficie totalmente reflectante que devuelve la radiación transmitida otra vez a través de la muestra hasta los detectores. Por ello, se la denomina también a esta modalidad de doble transmisión. Por último, la modalidad de interactancia-reflectancia hace alusión al uso de una sonda de fibra óptica constituida por anillos concéntricos, siendo el exterior de los mismos por el que se ilumina la muestra y el interior por el que se devuelve la energía reflejada de la muestra. Para la recogida del espectro NIR, la sonda debe contactar con la superficie de la muestra (García, 2002; Pérez-Marín, 2005; Alcalá, 2006).

Los instrumentos NIR permiten en la actualidad, debido a la gran variedad de adaptadores, al empleo de fibra óptica, y a los nuevos diseños portátiles y manuales realizar análisis *off-line*, *at-line*, *on-line* e *in-line*. De forma descriptiva, realizar un análisis *off-line* consiste en un muestreo manual con un posterior análisis en el laboratorio; un análisis *at-line* consiste en la realización de un muestreo manual pero realizando el análisis sin salir de la zona de producción; un método *on-line* es aquel que realiza un muestreo automático enviando la muestra a la zona de análisis que se dispone en una zona anexa a la línea de producción para después enviar de nuevo la muestra a la cadena productiva; y una técnica analítica *in-line* es aquella que se realiza dentro de la línea de producción introduciendo una fibra óptica o mediante no contacto con la muestra. Las dos últimas se consideran así mismo medidas *in situ*.

El avance en el perfeccionamiento de la instrumentación NIRS, ha ido evolucionando desde finales de los años sesenta hasta nuestros días. Los cambios más relevantes que se han producido en los instrumentos NIRS son aquellos relacionados con la mejora de la relación señal/ruido, la precisión en la longitud de onda, la disponibilidad de diferentes sistemas de interacción de la radiación con la muestra y la existencia de una gran variedad de accesorios (cápsulas y cubetas de diferente forma, diferentes tipos de fibras ópticas para su utilización *in-line*, *on-line* y *at-line*, etc.) y de diseños más ergonómicos y portátiles.

Los componentes básicos de un instrumento NIRS son: una fuente de energía radiante, un dispositivo para la discriminación de longitudes de onda, un sistema de presentación de muestras y uno o varios detectores que convierten la energía radiante en señal eléctrica. Con la ayuda de un amplificador de alta tensión y bajo ruido, la señal

procedente de los detectores es amplificada. Posteriormente, esta señal es convertida en digital mediante un convertidor analógico-digital, y por último la señal digital es transmitida a un ordenador para su procesado (Shenk y Westerhaus, 1995a; Bertrand, 2000) (Figura 2).



**Figura 2. Componentes básicos de un instrumento NIRS**

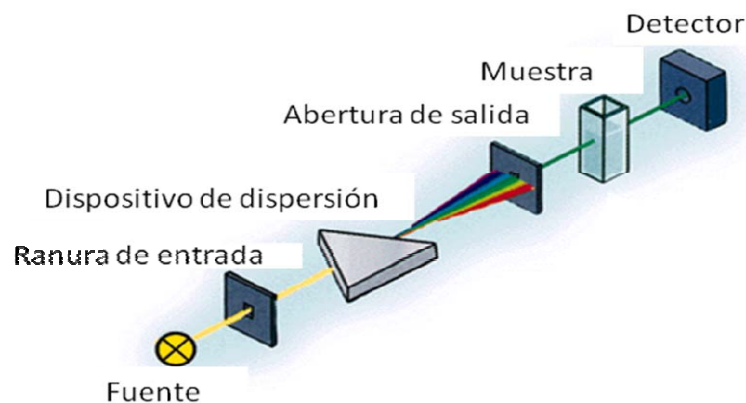
Los instrumentos NIR se pueden clasificar en distintas categorías en función de las características de los componentes que forman el instrumento, destacando entre ellos, la configuración óptica del equipo, la velocidad de recogida del espectro, el tipo de fuente o de detector empleados, la técnica de muestreo (para mediar los efectos de presentación de las muestras), la protección contra polvo y humedad y la tolerancia a las vibraciones (Workman y Burns, 2001).

El diseño óptico del equipo y dentro de éste, el dispositivo utilizado para la selección de longitudes de onda, es el criterio más utilizado para la clasificación de instrumentos NIRS.

En el mercado existen equipos dispersivos que trabajan con todo el rango NIR, ya que utilizan un sistema monocromador de difracción móvil (*grating*) detectando cada longitud de onda independientemente en el tiempo; equipos de filtros que sólo trabajan con determinadas longitudes de onda; equipos de red de diodos que pueden trabajar con todo el rango espectral detectando todas las longitudes de onda a la vez, ya que tienen

un detector para cada una; equipos FT-NIR (Transformada de Fourier) que pueden trabajar con todas las longitudes de ondas simultáneamente, entre otros.

En la actualidad hay una marcada tendencia hacia la utilización de instrumentos de red de diodos (Figura 3) debido a las ventajas que presentan respecto a la velocidad de recogida de la señal (el tiempo de integración es normalmente 50 ms pero puede ser incluso inferior) y a la ausencia de partes móviles lo que los hace adecuados para su implementación *on-line*, en líneas de clasificación de materias primas de la industria frutícola (Nicolai et al., 2007).

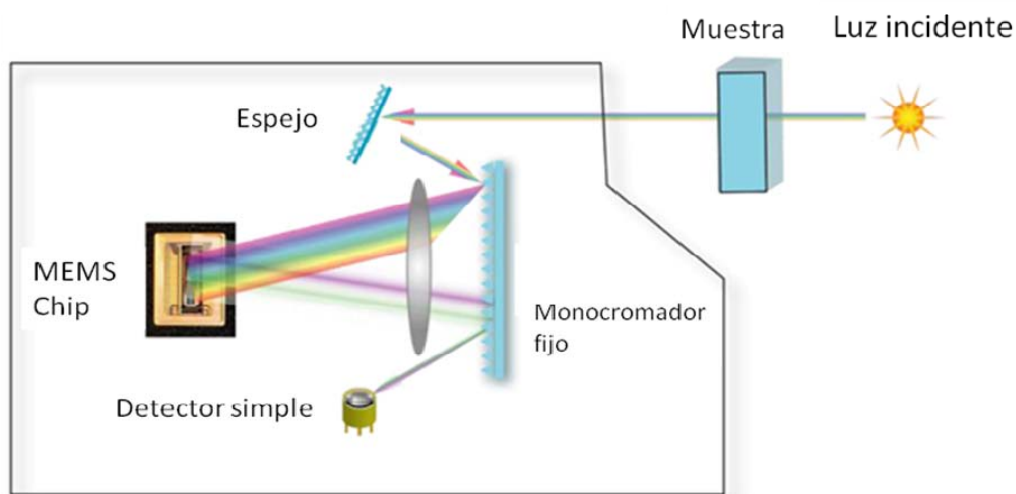


**Figura 3. Componentes básicos de un instrumento NIRS de red de diodos**

No obstante, es importante señalar que en los últimos años se ha incrementado el interés por realizar evaluaciones NIRS en el lugar de origen de la muestra y no a la inversa. Esta tendencia hacia la utilización de la tecnología NIRS *in situ*, ha hecho necesaria además de la miniaturización de los componentes ópticos, la aplicación de nuevas técnicas como la Espectroscopía de Transformación Digital (DTS, *Digital Transform Spectroscopy*) que han hecho posible el desarrollo de equipos NIRS portátiles y compactos haciéndolos más prácticos para su uso en campo o bien para ser implementados en vehículos como los tractores.

La combinación de sistemas microelectromecánicos (MEMS, *Microelectromechanical Systems*) y la Espectroscopía de Transformación Digital (DTS), es una de las aportaciones más novedosas que se ha realizado en el ámbito de la integración de otros sensores con la tecnología NIRS.

Los sistemas MEMS (Figura 4) están basados en la construcción de dispositivos fabricados usando tecnología de micro-fabricación a partir de semiconductores, normalmente silicio, con funciones mecánicas. La superficie de un dispositivo MEMS consiste en una serie de elementos reflectivos largos, estrechos y programables, agrupándose cada área del mismo como un píxel.



**Figura 4. Componentes básicos de un instrumento NIRS-MEMS**

NIRS-MEMS es una tecnología basada en la utilización de un chip o dispositivo MEMS para la dispersión de los espectros recogidos. Este dispositivo puede ser controlado de forma que se bloquee la absorción de luz en determinadas regiones del espectro favoreciendo la absorción/reflectancia en otras partes del espectro. Así, aplicando un determinado voltaje a los distintos píxeles del dispositivo MEMS es posible controlar qué píxeles difractarán luz y cuáles la reflejarán en su región espectral correspondiente, siendo la luz reflejada la que llegará al detector. El escaneo de cada píxel permitirá la obtención del espectro completo. La luz reflejada por el producto es entonces recogida por un único detector, siendo ésta una de las mayores ventajas en cuanto a reducción de costes que presenta la tecnología NIRS-MEMS con respecto a los equipos de red de diodos (Day et al., 2005), ya que estos últimos, que constituyen la generación de instrumentos previa a los NIRS-MEMS, incorporan un conjunto de detectores lo que provoca que sean normalmente fabricados en rangos espectrales de la

zona baja (800-1100 nm) o media (hasta 1700 nm) dentro del infrarrojo cercano, para poder ser competitivos en coste. Los sensores NIRS-MEMS en cambio al incorporar un único detector permiten abarcar toda la región del infrarrojo cercano (hasta 2500 nm) con inferiores costes de producción (Coates y Ramani, 2006).

A pesar de la existencia en el mercado de algunos equipos de diseño manual y alta portabilidad, la información científica disponible sobre aplicaciones NIRS-MEMS en el sector agroalimentario es muy limitada. En el ámbito hortofrutícola el primero de estos trabajos fue publicado en el año 2009, y mostraba la capacidad del equipo manual Phazir™ (Polychromix, Inc., Wilmington, MA, EE.UU.) (Figura 5) para determinar de forma no destructiva ciertos parámetros cuantitativos de nectarinas durante su maduración en árbol y almacenamiento poscosecha (Pérez-Marín et al., 2009). Posteriormente, en el año 2010 se publicó un segundo trabajo con este tipo de instrumento destinado a la determinación de la vida útil poscosecha de ciruelas (Pérez-Marín et al., 2010). En el año 2011, dicha tecnología e instrumento han sido empleados de nuevo para el control de calidad en árbol y poscosecha de nectarinas cultivadas en distintos regímenes hídricos (Pérez-Marín et al., 2011; Sánchez et al., 2011), siendo posteriormente utilizado en la determinaciones de calidad poscosecha de fresas (Sánchez et al., 2011).

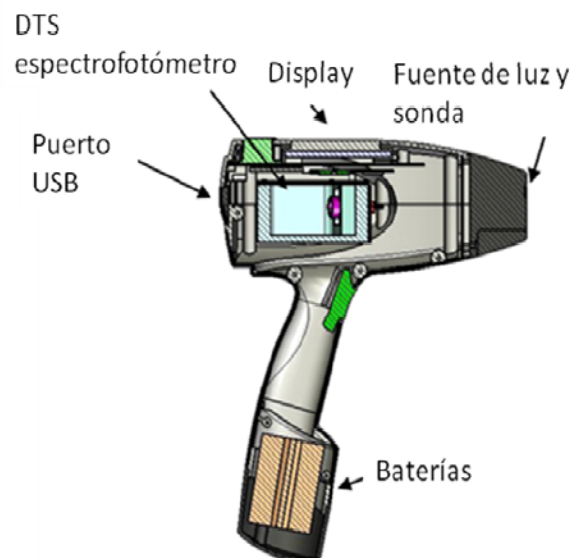


Figura 5. Instrumento portátil NIR-MEMS Phazir™

Desde un punto de vista de control de procesos, estas dos últimas modalidades de análisis (redes de diodos y MEMS) son las más interesantes para tomar decisiones en un reducido margen de tiempo que permitan controlar tanto la calidad del producto final como la eficiencia del proceso productivo (Pérez-Marín et al., 2009).

### **3.6.3. Análisis quimiométrico de datos espectroscópicos NIRS.**

Un gran avance en la aplicación de las técnicas espectroscópicas para el análisis de los alimentos y otras materias primas tiene su origen en el desarrollo de algoritmos matemáticos para el procesado de la información espectral. Estos métodos de análisis de datos permiten la extracción de información valiosa de grandes y complejos conjuntos de datos y respaldar la aplicación de la espectroscopía de infrarrojo en muchos campos de análisis (Martens, 1999; Smyth, 2005; Woodcock et al., 2008; Karoui et al., 2010).

La tecnología NIRS supone una rápida adquisición de gran cantidad de datos que se deben evaluar e interpretar para transformarlos en información útil. La quimiometría, disciplina que tiene esta finalidad, contempla todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos complejos en información. Para ello utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines, por lo que se sitúa en un campo interdisciplinar (Casale et al., 2010).

La Espectroscopía NIR es una técnica ampliamente usada como método de análisis cuantitativo y cualitativo, para lo cual es necesario el desarrollo de modelos de predicción.

El modelo de predicción NIRS relaciona la información espectral de las muestras que constituyen el colectivo de aprendizaje con sus valores para el parámetro en estudio, proporcionados por un método de referencia. Una vez desarrollado el modelo, éste permite predecir el contenido de otras muestras de características similares a las incluidas en el grupo de entrenamiento o calibración.

Para extraer la información química relevante de cada muestra es necesario recurrir al uso de pretratamientos de la señal espectral, que permiten separar la

información meramente química de las variaciones de origen físico (textura, tamaño, geometría de las partículas, etc.).

En las señales obtenidas en espectroscopía existen normalmente componentes o efectos no deseados, también conocidos como ruidos. Estos tienen diferentes orígenes o causas y afectan de distinta forma al espectro. Los componentes de la instrumentación utilizados para el registro del espectro (ruido instrumental), las variaciones de temperatura, humedad u otras condiciones ambientales durante el registro (ruido ambiental) o bien las variaciones en la señal debidas a la propia naturaleza de la muestra, pueden ser algunas de las causas del ruido. Otra de las finalidades de los pretratamientos espectrales es corregir o reducir este ruido.

Los pretratamientos más tradicionalmente utilizados son la derivación, y los tratamientos de corrección del efecto “scatter” o radiación dispersa denominados corrección multiplicativa del efecto del *scatter*, Standard Normal Variate (SNV) y Detrend (DT) (Shenk y Westerhaus, 1995a; Heise y Winzen, 2002; Naes et al., 2002; Nicolai et al., 2007).

Es un hecho que con normalidad se combinen varios métodos de pretratamiento espectral para eliminar en mayor cuantía el ruido espectral y mejorar así la calidad de los resultados. Combinaciones de SNV-DT ó DT-SNV y su combinación con derivadas son habituales.

Es aconsejable realizar estudios previos antes de aplicar las técnicas de preprocesado de la señal espectral, ya que con ello se elimina una fracción de la información almacenada, y determinar así la estrategia más adecuada para el colectivo de muestras o si es necesario aplicar más de un pretratamiento para llevar a cabo la corrección de datos.

Después de los pretratamientos de la señal espectral, los siguientes pasos están orientados a desarrollar una ecuación de calibración capaz de predecir parámetros de calidad de otras muestras con características similares a las incluidas en el colectivo de aprendizaje (Shenk y Westerhaus, 1995b, 1996; Williams y Sobering, 1996).



### 3.6.3.1. Análisis de Componentes Principales (ACP)

Uno de los métodos más utilizados y que es recomendable aplicar como etapa inicial de cualquier análisis multivariante para estudiar la población de muestras con la que se va a trabajar es el Análisis de Componentes Principales (ACP). Con este algoritmo se consigue sintetizar la información espectral, detectar muestras anómalas, obtener información sobre las variables (longitudes de onda) más importantes e indicaciones sobre el tipo de modelo es más adecuado para ese colectivo de muestras.

La finalidad es desarrollar un modelo bilineal donde los valores de absorbancia NIR sean las variables originales, las cuales se combinan para formar otras denominadas Componentes Principales (CP's) (Jackson, 1991).

El objetivo del ACP es hallar las direcciones que explican la máxima variabilidad de las muestras y utilizarlas como nuevos ejes de coordenadas, llamados componentes principales (CP's). De esta forma, se reduce la dimensionalidad de un espacio de "k" dimensiones a un espacio de "a" dimensiones ( $a < k$ ), manteniendo intacta la información relevante del sistema. Cada componente principal contiene información de diferente relevancia, describiendo la fuente de variación más importante de los datos.

Los algoritmos CENTER y SELECT, incluidos en el software WINISI, (Infrasoft Internacional, Port Matilda, PA, EE.UU.) permiten el estudio de la estructura y variabilidad espectral de la población de muestras y la selección de muestras que constituirán el colectivo de calibración. Dichos algoritmos se basan en la realización de un análisis de componentes principales (ACP), seguido del cálculo de distancias entre los espectros de las distintas muestras en un espacio n-dimensional, a través generalmente de la distancia de Mahalanobis (Shenk y Westerhaus, 1995b, 1996). Al mismo tiempo, estos procedimientos permiten detectar aquellas muestras con comportamiento diferente, denominadas "anómalas" (outliers), cuya anomalía puede ser causada tanto por la información espectroscópica o físico-química.

Williams y Norris (2001) realizan una detallada descripción de las posibles causas de los espectros anómalos; así mismo, señalan que la detección, interpretación y posible eliminación de estas muestras anómalas es una etapa crítica en el desarrollo de modelos de predicción, debido a la gran influencia que provoca su presencia en los resultados del mismo.

Estos procedimientos previos se realizan para definir el colectivo de calibración, ya sea para la construcción de ecuaciones de calibración (análisis cuantitativo) como para modelos de clasificación (análisis cualitativo).

### *3.6.3.2 Análisis cuantitativo. Calibración multivariante*

Según Geladi (2003) la aplicación más exitosa de la combinación de la quimiometría con datos espectrales es el desarrollo de modelos de calibración multivariantes. En el caso de modelos cuantitativos, se desea utilizar la información espectral para determinar la concentración de uno o varios componentes o parámetros en una muestra del producto analizado. Cuando se trabaja con información NIRS, es fundamental el uso de métodos multivariantes para poder relacionar la información de múltiples variables con el parámetro o parámetros de interés.

La mayoría de las técnicas matemáticas aplicadas para el desarrollo de calibraciones se basan en métodos lineales de ajuste, aunque también existen algoritmos no lineales.

Los métodos lineales obtienen una relación lineal entre la señal espectral y la concentración de cada componente de interés que se quiere determinar de la muestra. Esto se basa en asumir que la relación entre la absorbancia y la concentración del analito establecida por la ley de Lambert-Beer es lineal.

Para el desarrollo de una calibración existen diferentes métodos de regresión lineal (Martens y Naes, 1989; Burns y Ciurczak, 1992, 2001), siendo los más utilizados en las aplicaciones cuantitativas NIRS la Regresión Lineal Múltiple (RLM ó MLR), la Regresión por Componentes Principales (RCP ó PCR), la Regresión mediante Mínimos Cuadrados Parciales (RMCP ó PLS) y la Regresión mediante Mínimos Cuadrados

Parciales Modificada (RMCPM ó MPLS), siendo éstas dos últimas las más empleadas en aplicaciones agroalimentarias (Shenk y Westerhaus, 1995b, Pérez-Marín et al., 2007).

La regresión lineal múltiple utiliza en su totalidad las longitudes de onda del espectro para realizar el ajuste del modelo, seleccionando algunas variables espectrales del espectro NIR completo. Las longitudes de onda seleccionadas son aquellas que presentan una correlación más elevada entre el valor de absorbancia a una longitud de onda determinada y el dato de referencia correspondiente (Martens y Naes, 1989; Workman, 1992).

La regresión en componentes principales realiza una reducción de las variables originales utilizando las componentes principales calculadas mediante un análisis ACP. Con las nuevas variables ortogonales entre sí realiza un ajuste de regresión múltiple. Este algoritmo solo usa la información espectral para calcular las nuevas variables, por lo que éstas son las que mejor representan la matriz de datos, pero no necesariamente son las más adecuadas para estimar los parámetros de interés a predecir (Massart et al., 1998).

La regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) parte de la premisa de que la información espectral es función de unas pocas variables linealmente independientes, teniendo en cuenta para el cálculo de dichas variables no solo la información espectral sino además el valor de referencia del parámetro medido para cada muestra (Westerhaus et al., 2004).

Tanto, la regresión en componentes principales como la regresión en mínimos cuadrados parciales son métodos de calibración que trabajan con el espectro completo, aunque sintetizando el mismo en una serie de variables linealmente independientes para evitar la colinealidad de los datos (Shenk y Westerhaus, 1995a). El uso de estas técnicas presenta, entre otras muchas, la ventaja de no tener que seleccionar las longitudes de onda con las que se desarrolla el modelo, si bien su empleo dificulta la interpretación química de las mismas (Mark y Workman, 1991; Workman, 1992).

La regresión MPLS es una variante de la regresión PLS, cada cual para cada longitud de onda, los residuos obtenidos después del cálculo de un término, son estandarizados (divididos por la desviación estándar de los residuales a dicha longitud) antes de calcular el término siguiente (Shenk y Westerhaus, 1995a). Según indican Shenk y Westerhaus (1995a) este método es a menudo más preciso y estable que el algoritmo PLS para productos agroalimentarios, siendo el número de factores de la regresión seleccionado por validación cruzada (Shenk y Westerhaus, 1995a).

La validación cruzada es un algoritmo que selecciona diferentes colectivos de calibración y validación dentro de una población específica. El procedimiento consiste en dividir el colectivo de calibración en grupos (dependiendo del número de muestras). Cada grupo de validación es predicho una vez con la ecuación desarrollada a partir del resto de grupos. Este procedimiento además previene el sobreajuste del modelo (Shenk y Westerhaus, 1995a; Williams, 2001). Los errores de la misma son evaluados mediante el estadístico Error Típico de Validación Cruzada (ETVC) que es similar al Error Típico de Predicción (ETP) (Shenk y Westerhaus, 1995a; Williams, 2001).

El ET o error típico, estima la capacidad predictiva del modelo para un colectivo de muestras nuevas, es el más habitual. Normalmente en la construcción de un modelo quimiométrico se utiliza un colectivo de calibración, en el que el ET será de calibración (ETC) y uno de validación externa, en el que el ET será de predicción (ETP).

El error típico de calibración (ETC) que se define como la desviación típica de los residuales (diferencia entre el valor aportado por el método de referencia y el valor estimado por la ecuación) para el colectivo de calibración (Williams, 2001). Sin embargo, suele sobreestimar la capacidad real de predicción de una ecuación al ser únicamente un estimador del error del modelo quimiométrico empleado (Mark y Workman, 1991; Shenk y Westerhaus, 1995b).

El error típico de predicción (ETP) es conocido como la desviación típica de las diferencias, para un colectivo de validación, entre el valor determinado mediante el método de referencia y el valor estimado mediante el análisis NIRS y es el estadístico más empleado para estimar la capacidad de predicción de una ecuación de calibración

NIRS (Mark y Workman, 1991; Shenk y Westerhaus, 1995b; Williams, 2001; Wise et al., 2006).

Asimismo, el estadístico RPD (Ratio of standard error of performance to standard deviation) que mide la relación entre la desviación típica del colectivo muestral de calibración y el ETCV y el estadístico RER (Ratio of standard error of performance to range of standard data), que establece la relación entre el rango de los datos de referencia de un determinado constituyente y el ETVC para el colectivo de validación cruzada, son estadísticos muy útiles usados en la evaluación de aplicaciones NIRS (Williams, 2001).

Según Williams (2001) considera que el RPD es un estadístico sencillo y que permite la evaluación del ETVC o del ETP en términos de la desviación típica de los datos de referencia para la población en estudio. De hecho, la eficiencia del análisis NIRS viene definida por la consistencia de las desviaciones de los datos predichos con respecto a los datos de referencia, esto es, el ETP o ETVC. Por tanto, si ETP o ETVC son similares a la desviación típica (o incluso superiores), significaría que la calibración no estaría prediciendo los valores correctamente. Estos estadísticos deben ser inferiores a la desviación típica. Williams (2001) señala que valores del RPD comprendidos entre 3 y 5 indican predicciones NIRS eficientes.

El significado de algunos valores de los estadísticos RPD y RER en relación con la aplicación de la tecnología NIRS en el control de productos y procesos en la Tabla 1.

**Tabla 1. Valores de los estadísticos de RPD y RER relacionados con el control NIRS de productos y procesos**

<b>RPD</b>	<b>RER</b>	<b>Clasificación</b>	<b>Aplicación</b>
0,0 – 2,3	< 6	Muy pobre	No recomendada
2,4 – 3,0	7 – 12	Pobre	Clasificación grosera
3,1 – 4,9	13 – 20	Pasable	Clasificación
5,0 – 6,4	21 – 30	Bueno	Control de calidad
6,5 – 8,0	31 – 40	Muy bueno	Control de procesos
> 8,1	> 41	Excelente	Cualquier aplicación

Fuente: Williams, 2001.

El estadístico RER, anteriormente definido es otra forma de estandarizar el ETP y el ETVC. El valor del RER debería ser tan alto como fuera posible, pero puede ser aumentado de forma ficticia por una presencia de muestras extremas en concentración lo cual le resta utilidad y consistencia. Esto no ocurre cuando para estandarizar el ETP o ETVC utilizamos la desviación típica, es decir, utilizando el RPD.

El coeficiente de variación (CV) que relaciona la desviación típica con la media, es otro estadístico de uso tradicional en química analítica y de utilidad para la interpretación de datos NIRS. El tamaño e interpretación del CV depende parcialmente de la fuente de los datos, es decir, de que se trate de datos de vía húmeda, datos predichos NIRS, datos de parámetros “funcionales” como dureza, digestibilidad, etc., (Williams, 2001). La interpretación del coeficiente de variación en relación con la aplicación de la tecnología NIRS para el control de productos y procesos se puede realizar en base a varios criterios (Tabla 2).

**Tabla 2. Criterios de interpretación de los valores del coeficiente de variación en relación con el control NIRS de productos y procesos**

CV (%)	Análisis químico	Análisis predichos NIRS; parámetros químicos	Análisis predichos NIRS; parámetros funcionales
> 0,5	Excepcional	Imposible de obtener	Imposible de obtener
0,6 – 1,0	Excelente	Excepcional	Imposible de obtener
1,1 – 2,0	Muy bueno	Excelente	Excepcional
2,1 – 3,0	Bueno	Muy bueno	Excelente
3,1 – 4,0	Pasable	Bueno	Muy bueno
4,1 – 5,0	Mediocre	Pasable	Bueno
> 5,1	Necesita investigación	Mediocre	Pasable

Fuente: Williams, 2001.

De acuerdo con la Tabla 2, valores del CV para datos predichos NIRS del 2 al 3% son considerados muy buenos para el control de calidad de parámetros químicos.

Las aproximaciones no lineales en el desarrollado de modelos cuantitativos de predicción son necesarias cuando la relación que se pretende modelizar no es lineal. Esto ocurre en diversas ocasiones como incumplimiento de la Ley de Lambert-Beer a concentraciones elevadas de un analito, efectos multiplicativos de la señal instrumental, efectos de naturaleza intrínseca al parámetro que se persigue medir (Bertran et al., 1999) o colectivos de muestras muy amplio y variable (Barton II et al., 2000).

En ocasiones estas desviaciones de la linealidad se pueden corregir con pretratamientos matemáticos de la señal instrumental, pero cuando estas tendencias son muy marcadas una de las posibles alternativas es utilizar aproximaciones locales basadas en el desarrollo de calibraciones específicas para cada muestra a predecir, las cuales permiten el manejo de la no-linealidad existente a través de la producción de modelos lineales “locales” (Pérez-Marín, 2005; Pérez-Marín et al., 2007).

La calibración local se basa en el ajuste local de la mayoría de las superficies de regresión mediante modelos lineales (Naes et al., 2002). Shenk et al., (1997) afirman que el mejor método de predicción debe ser aquel que calcule una calibración específica para cada muestra a predecir, usando un pequeño colectivo muestral de aprendizaje

constituido por muestras semejantes a la desconocida, seleccionadas dentro de una amplia biblioteca.

Con la calibración local se consigue modelizar la no-linealidad presente en los datos, a través de la selección de subgrupos de muestras que presentan rangos de variabilidad para el parámetro analizado más restringidos, para los que la aplicación de técnicas de regresión lineales si es adecuada. Además pueden aprovechar la falta de homogeneidad de las muestras de la librería muestral de partida, usando información espectral para la selección de colectivos de calibración local que, por ejemplo, tengan similares tamaños de partícula o similares contenidos en humedad que la muestra desconocidas que se quiere predecir.

Dentro del marco de definición general de los fundamentos de la calibración local existen una amplia variación entre los distintos métodos propuestos, tanto en forma de seleccionar el colectivo de calibración a usar, como en la forma de llevar a cabo la regresión posterior (Anderssen et al., 2003; Fearn y Davies, 2003).

Entre los tipos de aproximaciones locales que se describen en la literatura, el algoritmo LOCAL patentado por Shenk y Westerhaus (1998), es uno de los que han sido más ampliamente utilizado en aplicaciones NIRS.

Shenk et al., (2001) indican que el uso del algoritmo LOCAL puede mejorar la capacidad predictiva de un modelo obtenido mediante la estrategia de calibración global entre un 10% y un 30%, dependiendo de la diversidad espectral de las muestras contenidas en la biblioteca muestral. El algoritmo LOCAL permite una mayor rapidez en las predicciones (requiere de 1 a 2 segundos por muestra), lo que hace posible su implementación en el análisis de rutina de un laboratorio cualquiera (Shenk et al., 1997), siendo el único de los métodos de regresión local que esta incorporado en un programa comercial (WINISI, Infracsoft Internacional, Port Matilda, PA, EE.UU.).

### *3.6.3.3. Análisis cualitativo*

Aunque la forma más generalizada de aplicación de la tecnología NIRS en productos agroalimentarios se refiere a determinaciones de carácter cuantitativo, son



muchas las aplicaciones en las que el análisis cualitativo podría estar indicado, habiendo sido aplicado con éxito en distintos productos agroalimentarios (Le Moigne et al., 2008; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2011; Bao et al., 2012; Mladenov et al., 2012).

El análisis cualitativo NIRS se fundamenta en las características espectrales de las muestras y consiste en el desarrollo de modelos de clasificación atendiendo a esas características; se agrupan las muestras con espectros similares, separándolas de otras con espectros distintos (Downey, 1994, 1996). Este hecho amplía las aplicaciones de NIRS en el control de calidad de productos agroalimentarios hacia la identificación de muestras desconocidas, distinción entre variedades, autenticación de productos, clasificación por calidades, etc. (Paz et al., 2009a y b; Sánchez et al., 2009).

La mayoría de los métodos de análisis cualitativo se basan en medidas de similitud entre las características espectrales de unas muestras y otras. Dicha similitud se puede expresar en base a diferentes herramientas tales como correlación espectral, operaciones lógicas o cálculo de distancias (Pérez-Marín, 2005).

Dentro del análisis cualitativo NIRS se pueden distinguir principalmente tres aproximaciones (Penchev et al., 1999; Kramer et al., 2004). La primera de ellas hace referencia al análisis discriminante, en el que varios algoritmos son utilizados para determinar si una muestra pertenece a un grupo de muestras conocidas a través de comparaciones espectrales. En segundo lugar, se habla de métodos de reconocimiento de pautas, usados para determinar el grado de similitud entre el espectro de una muestra desconocida y una biblioteca espectral. Finalmente, la tercera de las estrategias se refiere a la interpretación espectral mediante asignación de bandas características.

A su vez, todos los métodos de clasificación se pueden agrupar en dos categorías, supervisados y no supervisados, dependiendo de si es conocida o no a priori la asignación de clases del colectivo de aprendizaje (Vandeginste et al., 1998; Heise y Winzen, 2002; Naes et al., 2002).

Los métodos no supervisados se usan generalmente cuando no se dispone de información previa del colectivo, pues no se requiere de ningún conocimiento previo de

los objetos para realizar su agrupamiento o clasificación, sino que ellos mismos definen las clases. El objetivo de este tipo de técnicas es identificar tendencias dentro de los colectivos de aprendizaje y construir subgrupos o clases en base a ellas (Naes et al., 2002). Mientras que en los métodos supervisados sucede lo contrario. Éstos se basan en el aprendizaje previo del sistema, utilizando colectivos de calibración o entrenamiento en los que las clases y la pertenencia de las distintas muestras a ellas ya se encuentran definidas (Vandeginste et al., 1998).

Según Pérez-Marín et al., (2006) dentro los procedimientos no supervisados, el más común es el análisis “clúster” o análisis de conglomerados, que es una técnica de clasificación multivariante cuya finalidad es definir las pautas naturales de agrupamiento dentro de colectivos, de forma que los perfiles de las muestras englobadas dentro de un mismo grupo son muy similares entre sí (cohesión interna del grupo) y los de las muestras de grupos diferentes son distintos (aislamiento externo del grupo). Otros métodos no supervisados son las redes neuronales de Kohonene, los métodos de análisis factorial, el método MST (*Minimal Spanning Tree*) e incluso también es considerado como tal, el análisis de componentes principales (Otto, 1999).

Por otro lado, los métodos supervisados se basan en el aprendizaje previo del sistema, utilizando colectivos de calibración o entrenamiento en los que las clases y la pertenencia de las distintas muestras a ellas ya se encuentran definidas (Vandeginste et al., 1998).

Los pasos a seguir en este tipo de métodos son la selección del colectivo de aprendizaje que debe estar compuesto por un conjunto de muestras analizadas espectralmente y cuya clasificación es conocida, selección de las variables de discriminación, obtención del modelo de clasificación mediante la aplicación de una regla o algoritmo de clasificación y finalmente, la validación de los modelos de clasificación (Pérez-Marín, 2005).

Entre los métodos supervisados orientados a la discriminación, los más aplicados en el ámbito de la Espectroscopía NIR son el análisis discriminante lineal (LDA, *Linear Discriminant Analysis*), el análisis discriminante cuadrático (QDA, *Quadratic Discriminant Analysis*) y el análisis discriminante mediante regresión. Por su parte, los

métodos supervisados dirigidos al modelado de clases más usualmente aplicados son el análisis discriminante por analogía de clases por modelos independientes (SIMCA, *Soft Independent Modelling of Class Analogy*) y las redes neuronales artificiales (Naes e Indahl, 1998; Vandeginste et al., 1998; Vigneau et al., 2000; Naes et al., 2002).

Una de las aproximaciones cualitativas más ampliamente utilizadas en aplicaciones NIRS a productos agroalimentarios es el análisis discriminante mediante regresión PLS, cuyos principios y procedimientos son idénticos a los usados para el análisis cuantitativo; con la diferencia que mientras para el análisis cuantitativo se mide la concentración de compuestos, en el análisis discriminante se utilizan variables discretas, de pertenencia o no a un determinado grupo (Vigneau et al., 2000; Naes et al., 2002; Kramer et al., 2004).

El análisis discriminante PLS utiliza un colectivo de entrenamiento para el desarrollo de modelos de predicción cualitativos que pueda aplicarse posteriormente a la clasificación de nuevas muestras desconocidas. Dicho modelo persigue correlacionar las variaciones espectrales (X) con las clases definidas (Y), tratando de maximizar la covarianza existente entre ambos tipos de variables. En este tipo de aproximación, las variables Y utilizadas no son variables continuas, como en el caso del análisis cuantitativo, sino que son variables categóricas artificiales o ficticias (“dummy”), creadas asignando el valor 0 a la muestra perteneciente a la categoría A y el valor 1 a la muestra perteneciente a la categoría B (Heise y Winzen, 2002; Naes et al., 2002; Kramer et al., 2004). Según indican Naes et al., (2002), la elección de los valores 0/1 para las variables ficticias es arbitraria, pudiendo ser considerados asimismo otros pares de valores como 1/2, 0/100. Downey (2000) sugiere que la elección de los valores de las variables no es importante siempre y cuando la matriz Y sea centrada y normalizada antes del análisis. Cuando existen dos clases a discriminar se aplica normalmente el algoritmo PLS1, ya que existe una única variable independiente que toma para cada muestra del colectivo de aprendizaje un valor de 0 ó 1. El criterio para la clasificación de muestras desconocidas en una u otra categoría dependerá de que el valor predicho se aproxime más a 0 ó a 1, respectivamente. Si existen más de dos clases a discriminar, sólo se podría usar PLS1 si se fuesen dividiendo las clases en grupos de dos de forma estratificada; aunque, en tal caso, la opción más apropiada sería el uso del algoritmo de

regresión multivariante PLS2. No obstante, este algoritmo también se puede utilizar cuando exclusivamente se dispone de dos clases (Naes et al., 2002).

El significado de las variables ficticias cambia ligeramente al aplicar PLS2. En esta aproximación, la variable independiente se convierte en un vector de clases, de forma que cada muestra tenga un valor de 1 en la clase a la que pertenece y un valor de 0 para el resto de clases (Vandeginste et al., 1998; Heise y Winzen, 2002; Naes et al., 2002). Por su parte, para la predicción de muestras desconocidas, se obtiene un valor de la variable discriminatoria para cada una de las clases establecidas; así, un valor de 1 en una de las categorías representaría una asignación perfecta a la misma, mientras que un valor de 0 indicaría la no pertenencia a dicha clase. Para una misma muestra, si los valores de las variables ficticias usados son 0 y 1, los predichos obtenidos para cada clase deben sumar 1.

Existen diversos criterios para clasificar muestras desconocidas. Aquellos en que las muestras desconocidas deben ser asignadas al grupo en el que presenten un mayor valor predicho de la variable discriminatoria (Naes et al., 2002; Kramer et al., 2004), y otros en los que el valor medio de las variables discriminatorias puede usarse como límite discriminatorio (Downey y Boussion, 1996; McElhinney y Downey, 1999; Woo et al., 1999).

Downey (2000) explica que el uso del valor medio sería de aplicación en el caso de que las clases estuviesen equilibradas en cuanto a número de muestras, pero recomienda calcular el límite de discriminación entre clases teniendo en cuenta la desviación típica de los valores predichos para cada clase.

Murray et al., (2001) describen otra aproximación similar en la que consideran lo que se denomina factor de incertidumbre para calcular el límite de discriminación. Esta opción está incorporada en el programa quimiométrico WinISI, en la opción de análisis discriminante mediante PLS2, y calcula el valor de la “mínima diferencia” para clasificar las muestras en una determinada categoría como el producto del error de ajuste del modelo por un factor de incertidumbre, cuyo valor está asociado al estadístico t de Student para un número de grados de libertad infinito. De esta forma, una muestra es clasificada de forma incierta en una clase cuando la diferencia entre el valor dado a

esa muestra en su clase y el valor que se le da en la/s otra/s clase/s es inferior al valor de la mínima diferencia (ISI, 2000).

### **3.7. APLICACIÓN DE LA TECNOLOGÍA NIRS PARA EL CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD EN EL SECTOR VITIVINÍCOLA**

Los primeros trabajos analíticos llevados a cabo con NIRS se desarrollaron a finales de los años sesenta para determinar humedad, proteína y grasa en productos agrícolas (granos y semillas: Norris y Hart, 1965; carne: Ben-Gera y Norris, 1968a; soja: Ben-Gera y Norris, 1968b). Posteriormente, su aplicación se ha extendido a la determinación de un gran número de parámetros en productos agroalimentarios, entre los que destacan las frutas y hortalizas.

En el caso de frutas como la uva y dada su compleja estructura, las ventajas de desarrollar métodos instrumentales destinados a describir, cuantificar y monitorizar su composición, son evidentes. Sin embargo, para ser de utilidad práctica en la industria vitivinícola, los métodos instrumentales deben ser objetivos, rentables y proporcionar resultados rápidos y reproducibles en funcionamiento continuo.

Actualmente existentes métodos analíticos tradicionalmente empleados para la determinación de la composición y la calidad de la uva, el vino y otras bebidas alcohólicas, los cuales no son adecuados para satisfacer las demandas de gestión de calidad y trazabilidad en un mercado global, debido a su coste y lento tiempo de respuesta. Incluso los análisis más sencillos requieren enviar las muestras a un laboratorio independiente con evidentes retrasos en la obtención de resultados (Cozzolino et al., 2007). Factores tales como la rapidez y bajo coste del análisis, mínima preparación de la muestra y el respeto al medioambiente, son de vital importancia para la sostenibilidad de la industria vitivinícola actual (McClure, 2003; Cozzolino et al., 2006; Nicolaï et al., 2007).

En los últimos 40 años la espectroscopía NIR se ha convertido en uno de los métodos más atractivos y utilizados de análisis en productos agroalimentarios, ya que permite la determinación simultánea, rápida y no destructiva de los principales

parámetros de dichos productos. Además, recientemente se han desarrollado estudios sobre nuevas aplicaciones NIRS que implican la determinación de componentes minoritarios en productos vegetales (McClure, 2003; Cozzolino et al., 2006; Nicolaï et al., 2007).

La información acerca de los constituyentes de la uva, el mosto y el vino, es de gran utilidad para la toma de decisiones en tiempo real en la industria vitivinícola permitiendo monitorizar y mejorar la adaptación de los sistemas de producción a los nuevos cambios. Medidas objetivas de la calidad permiten a los elaboradores alcanzar niveles superiores de la misma, lo que se traduce en un aumento de beneficios por parte de la industria enológica (Cozzolino et al., 2011a).

Para mejorar aún más la calidad de sus productos, la industria enológica tiene una evidente necesidad de técnicas simples, rápidas y baratas que evalúen objetivamente la calidad de la uva (Gishen et al., 2002; Kennedy, 2002; Francis et al., 2005). La determinación de las características de la uva que influyen decisivamente en la calidad final del vino, es un requisito básico para mejorar el viñedo y para la óptima producción del tipo de vino deseado (Cozzolino et al., 2007).

Por lo tanto, el disponer de una tecnología no destructiva, que sea rápida y precisa, de bajo coste, no contaminante y que pueda ser aplicada directamente en las líneas de producción, proporcionando datos en tiempo real, y con posibilidad de aplicación para caracterizar estándares de calidad de las muestras, es de gran interés y utilidad en el sector vitivinícola. La tecnología NIRS puede considerarse una candidata idónea para cumplir este objetivo, ya que reúne ampliamente los requisitos anteriormente indicados, permitiendo además de forma instantánea que un único análisis espectral proporcione información de atributos muy diversos (Paz et al., 2008; González-Caballero et al., 2010).

### **3.7.1. Determinaciones cuantitativas de los principales parámetros de calidad en uva utilizando NIRS**

El sabor y el aroma del vino está implícitamente condicionado por la uva, la fermentación y en general, por el proceso de elaboración. Para poder elaborar vinos de

la mejor calidad es necesario conocer la composición de la uva, permitiendo con ello la selección de las técnicas de fermentación del mosto, así como las posibles mezclas de mostos más adecuadas para elaborar el vino con las características buscadas por el enólogo. Asimismo, la determinación de la composición de la uva es fundamental para determinar correctamente el momento de la vendimia (Gishen y Dambergs, 1998; Gishen et al., 2002; Dambergs et al., 1999, 2003; Francis et al., 2005; Fadock, 2011).

Durante la maduración de la uva es imprescindible estudiar la evolución de determinados parámetros como el contenido en sólidos solubles, el pH, y la acidez titulable. Estos componentes son los responsables del contenido de alcohol, azúcar y acidez del vino, influyendo decisivamente en sus características organolépticas.

Las Tablas 3 y 4 recogen una revisión de los últimos estudios relacionados con la determinación de parámetros de calidad en uva *at-line*, e *in situ*, empleando la espectroscopía visible y de infrarrojo cercano (VIS-NIR). En dichas tablas se muestran la variedad analizada, el tipo de instrumento, la presentación de la muestra y el modo de interacción radiación-muestra, así como la región del espectro electromagnético utilizada para el desarrollo de los modelos de predicción desarrollados juntos con los valores de los estadísticos ETVC/ETP,  $r^2$  y RPD.

*3.7.1.1. Determinaciones cuantitativas at-line de los principales parámetros de calidad en uva utilizando NIRS*

En la Tabla 3 se muestran las principales aplicaciones de la tecnología NIRS para la determinación de la calidad de la uva realizadas *at-line*.



Tabla 3. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *at-line*

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (nm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
Acidez (málico + tartárico) (g l <sup>-1</sup> )	Wu et al., (2010)	-	-	Mosto	Red de diodos	Transmitancia	325-1075	5	10,30-16,8	0,32 °Brix	0,98	7,0
Ácidos fenólicos (mg g <sup>-1</sup> )	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,10-0,76	0,08 mg g <sup>-1</sup>	0,77	2,1
	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Hollejo	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,10-0,76	0,04 mg g <sup>-1</sup>	0,95	6,3
Antocianos totales (mg g <sup>-1</sup> )	Damborgs et al., (2003)	CS, GR, M y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	> 3000	0,2-2,6	0,05 mg g <sup>-1</sup>	0,95	3,8
	Cozzolino et al., (2004)	CS, M, y SH	-	Mosto	Red de diodos	Reflectancia	400-1100	60	0,4-1,7	0,06 mg g <sup>-1</sup>	0,96	4,2
	Cozzolino et al., (2005)	CS, M y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	143	0,54-2,21	0,14 (mg g <sup>-1</sup> )	0,90	3,1
	Damborgs et al., (2006)	CS, M, PN y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	550-1600	324	0,13-3,10	0,12 mg g <sup>-1</sup>	0,94	4,2
	Janik et al., (2007)	CS, M, PN y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	250	0,23-3,03	0,18 mg g <sup>-1</sup>	0,90	3,2
Antocianos (mg g <sup>-1</sup> )	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,24-11,14	0,53 (mg g <sup>-1</sup> )	0,96	4,8
	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Hollejo	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,24-11,14	0,36 mg g <sup>-1</sup>	0,97	4,4
Azúcares (OH, v/v)	Kemps et al., (2010)	C, CS, M y SH	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	320-1660	360	-	0,56 OH, v/v	0,96	5,1

C: Carménère; CH: Chardonnay; CS: Cabernet Sauvignon; G: Graciano; GR: Garnacha; M: Merlot; PN: Pinot Noir; R: Riesling; SH: Shiraz; V: Viura.

Tabla 3. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *at-line* (Continuación)

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (mm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
Azufre (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	84,4-280,0	14,45 mg kg <sup>-1</sup>	0,88	2,4
Calcio (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	145,6-580,0	60,89 mg kg <sup>-1</sup>	0,75	1,5
Compuestos fenólicos totales (mg g <sup>-1</sup> )	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	1,95-18,35	0,59 mg g <sup>-1</sup>	0,98	7,9
	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Hollejo	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	1,95-18,35	0,62 mg g <sup>-1</sup>	0,98	7,5
Compuestos glicosilados (µM)	Cynkar et al., (2009)	-	CH y R	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	13	333,5-734,0	-	-	-
Conductividad eléctrica (mS)	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	157,0-256,0	7,66 mg kg <sup>-1</sup>	0,87	2,0
Densidad (g l <sup>-1</sup> )	Kemps et al., (2010)	C, CS, M y SH	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	320-1660	360	-	122 g l <sup>-1</sup>	0,96	4,9
Fenoles totales (ua)	Cynkar et al., (2009)	-	CH y R	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	13	25,6-35,2	4,1 ua	4,84	-
Flavanoles (mg g <sup>-1</sup> )	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,41-6,92	0,35 mg g <sup>-1</sup>	0,97	5,8
	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Hollejo	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,41-6,92	0,16 mg g <sup>-1</sup>	0,99	13,6

C: Carménère; CH: Chardonnay; CS: Cabernet Sauvignon; G: Graciano; GR: Garnacha; M: Merlot; PN: Pinot Noir; R: Riesling; SH: Shiraz; V: Viura.

Tabla 3. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *at-line* (Continuación)

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (nm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
Flavonoles (mg g <sup>-1</sup> )	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,54-1,75	0,08 mg g <sup>-1</sup>	0,94	4,2
	Ferrer-Gallego et al., (2011)	G	-	Hollejo	Monocromador	Reflectancia	1100-2000	84	0,54-1,75	0,02 mg g <sup>-1</sup>	0,99	12,7
Fósforo (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	155,2-490,0	40,19 mg kg <sup>-1</sup>	0,70	1,7
Hierro (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	1,51-13,31	1,49 mg kg <sup>-1</sup>	0,60	1,5
IPT (ua)	Kemps et al., (2010)	C, CS, M y SH	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	320-1660	360	-	3,09 ua	0,29	1,2
Magnesio (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	97,59-210,0	12,93 mg kg <sup>-1</sup>	0,84	2,2
Manganeso (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	0,27-6,53	0,41 mg kg <sup>-1</sup>	0,71	1,6
Materia seca (% p/p)	Cozzolino et al., (2008)	C, CS, M y PN	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	400-2500	310	23,7-38,6-	0,83 % p/p	0,92	3,5
pH	Damberg et al., (2003)	CS, GR, M y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	> 3000	2,8-4,9	0,11		2,8
	Cozzolino et al., (2004)	CS, M y SH	-	Mosto	Red de diodos	Reflectancia	400-1100	60	3,6-4,3	0,05	0,92	2,2
	Cozzolino et al., (2005)	CS, M, y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	143	3,58-4,26	0,05	0,81	2,8

C: Carnènerè; CH: Chardonnay; CS: Cabernet Sauvignon; G: Graciano; GR: Garnacha; M: Merlot; PN: Pinot Noir; R: Riesling; SH: Shiraz; V: Viura.

Tabla 3. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *at-line* (Continuación)

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (nm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
pH	Damberg et al., (2006)	CS, M, PN y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	550-1600	276	2,8-4,90	0,08		3,0
	Cynkar et al., (2009)	-	CH y R	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	13	3,48-3,97	0,10	0,004	-
	Wu et al., (2010)	-	-	Mosto	Red de diodos	Transmitancia	325-1075	5	1,66-2,53	0,05	0,97	5,4
Potasio (mg kg <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2011b)	CS, M, PN y SH	CH	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	209	1570-3600	285,34 mg kg <sup>-1</sup>	0,78	1,7
SST (°Brix)	Jaren et al., (2001)	GR	V	Grano	Monocromador	Reflectancia	800-2500	30	14-28	1,04-1,59 °Brix	0,71-0,92	-
	Damberg et al., (2003)	CS, GR, M y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	> 3000	10,7-37,4	1,0 °Brix	0,99	10,3
	Arana et al., (2005)	-	CH y V	Grano	Monocromador	Reflectancia	800-2500	288	15-26	1,27 °Brix	0,67	1,9
	Cozzolino et al., (2005)	CS, M y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	400-2500	143	17,5-27,5	0,68 ° Brix	0,94	4,3
	Damberg et al., (2006)	CS, M, PN y SH	-	Mosto	Monocromador	Reflectancia	800-1600	324	10,7-37,4	0,34 °Brix	0,96	8,8
	Cynkar et al., (2009)	-	CH y R	Grano homogeneizado	Monocromador	Reflectancia	400-2500	13	19-24	1,12 °Brix	0,14	-
	Wu et al., (2010)	-	-	Mosto	Red de diodos	Transmitancia	325-1075	5	10,3-16,8	0,32 °Brix	0,98	6,97
Taninos condensados (mg g <sup>-1</sup> )	Cozzolino et al., (2008)	C, CS, M y PN	-	Grano	Monocromador	Reflectancia	400-2500	140	2,8-9,72	0,46 mg g <sup>-1</sup>	0,86	3,3

C: Carménère; CH: Chardonnay; CS: Cabernet Sauvignon; G: Graciano; GR: Garnacha; M: Merlot; PN: Pinot Noir; R: Riesling; SH: Shiraz; V: Viura.

El análisis de la Tabla 3 indica que la mayor parte de las determinaciones de parámetros de calidad en uva realizadas *at-line* han sido llevadas a cabo empleando instrumentos monocromadores (Dambergs et al., 2003, 2006; Cozzolino et al., 2005, 2008, 2011b; Janik et al., 2007; Cynkar et al., 2009; Ferrer-Gallego et al., 2011), frente a los equipos de redes de diodos utilizados por Cozzolino et al., (2004); Kemps et al., (2010); Wu et al., (2010).

Asimismo, se puede observar que la mayoría de los trabajos realizados utilizan la región del visible junto con la región NIR (400-1100 nm y 400-2500 nm), mientras que son más escasos los trabajos de investigación que utilizan instrumentos que trabajen exclusivamente en la región NIRS (800-2500 nm y 1100-2000 nm).

Igualmente, el modo de interacción de la muestra con el instrumento en todos los trabajos realizados ha sido la reflectancia, a excepción de Wu et al., (2010) quienes utilizan la transmitancia.

Es importante señalar que la mayoría de las modelos NIRS desarrollados para los distintos parámetros de calidad de uva ensayados han empleado la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), método muy extendido para aplicaciones agroalimentarias en este ámbito, siendo escasos los estudios que utilizan modelos de regresión no lineal como LOCAL (Dambergs et al., 2003, 2006), máquinas de vectores soporte (Chauchard et al., 2004), redes neuronales (Janik et al., 2007). Sin embargo, dichos autores, obtienen modelos más robustos y precisos al emplear técnicas de regresión no lineales.

Dentro de los parámetros de calidad destinados a la determinación de la composición de la uva ha sido el contenido en sólidos solubles totales el más estudiado (Jarén et al., 2001; Dambergs et al., 2003, 2006; Arana et al., 2005; Cozzolino et al., 2005; Cynkar et al., 2009; Wu et al., 2010). Los valores de los estadísticos obtenidos por Dambergs (2003, 2006) muestran la excelente capacidad de NIRS para la predicción de dicho parámetro ( $RPD = 10,3$ ;  $r^2 = 0,99$  y  $RPD = 8,8$ ;  $r^2 = 0,96$ , respectivamente), siendo el análisis del contenido en sólidos solubles totales esencial para la industria

enológica, ya que su determinación establece el grado de madurez del fruto y es una medida aproximada de la concentración en azúcares del mismo. El conocimiento de este parámetro permitirá la estimación del contenido alcohólico probable del vino, favoreciendo la separación de la uva por calidades, lo que posibilitará elaborar vinos de la mejor calidad.

Los estudios realizados sobre este parámetro utilizan en su mayoría como forma de presentación de la muestra al instrumento el mosto (Dambergs et al., 2003; 2006; Cozzolino et al., 2005; Wu et al., 2010) excepto Jarén et al., (2001) y Arana et al., (2005) quienes utilizan grano, mientras que Cynkar et al., (2009) es el único que utiliza grano homogeneizado (trituración del grano obteniendo una pasta homogénea). Todos los trabajos emplean la región del visible junto con la región NIR (400- 1100 nm y 400-2500 nm).

El pH también ha sido un parámetro estudiado en diferentes trabajos de investigación realizados con instrumentos NIRS dispuestos *at-line* (Dambergs et al., 2003, 2006; Cozzolino et al., 2004, 2005; Cynkar et al., 2009; Wu et al., 2010). Sin embargo, los resultados de los estadísticos de los modelos predictivos desarrollados sólo fueron satisfactorios para Wu et al., (2011) (RPD = 5,4;  $r^2 = 0,97$ ). El resto de los autores desarrollaron modelos considerados de baja o muy baja capacidad predictiva. No obstante, la importancia de la determinación del pH es clave en la industria enológica para llevar a cabo las correcciones necesarias en mostos, así como para la elaboración de vinos de calidad.

En los trabajos destinados a la determinación de pH se utilizó como forma de presentación de la muestra al instrumento el mosto, a excepción de Cynkar et al., (2009) quienes emplean el grano homogeneizado, no utilizándose la presentación en grano en ninguno de los trabajos realizados.

Recientemente, diversos autores han abordado la determinación del contenido en antocianos empleando NIRS (Dambergs et al., 2003, 2006; Cozzolino et al., 2004, 2005; Janik et al., 2007; Ferrer-Gallego et al., 2011). Los valores de  $r^2$  obtenidos para este parámetro indican que los modelos desarrollados permiten la clasificación en alta, media y baja del contenido en antocianos de los frutos analizados (Williams, 2001).

Para la industria enológica, el disponer de datos sobre dicho parámetro es muy importante ya que los antocianos tienen una influencia directa sobre el contenido polifenólico de los vinos. La concentración de este parámetro durante la maduración de la uva, aumenta hasta alcanzar un punto máximo después del cual disminuye ligeramente, condicionando de forma definitiva la calidad del vino tinto.

Los estudios realizados en antocianos con tecnología NIR utilizan el mosto como forma de presentación de la muestra al instrumento, a excepción del realizado por Ferrer-Gallego et al., (2011) quienes utilizan grano y hollejo, empleando la reflectancia como modo de interacción de la muestra al instrumento. De nuevo el rango espectral utilizado es el que recoge la región del visible junto con la región NIR (400-1100 nm y 400-2500 nm).

En el último año, se han llevado a cabo el desarrollo de aplicaciones NIRS destinadas a la determinación en uvas del contenido en ácido málico (Wu et al., 2011) y azufre, calcio, fósforo, hierro, magnesio, manganeso y conductividad eléctrica (Cozzolino et al., 2011b).

Así, Wu et al., (2001) utilizando el mosto como forma de presentación de la muestra al instrumento, obtuvieron excelentes modelos de predicción del contenido en ácido málico en uvas ( $RPD = 7$ ,  $r^2 = 0,98$ ), confirmando la viabilidad de NIRS para la predicción de dicho parámetro. Asimismo, Cozzolino et al., (2011b) utilizando el grano homogeneizado como forma de presentación, obtienen resultados prometedores para la predicción del contenido en metales (S, Ca, P, Fe, Mg y Mg) así como para la determinación de la conductividad eléctrica de la uva.

*3.7.1.2. Determinaciones cuantitativas in situ de los principales parámetros de calidad en uva utilizando NIRS*

En la Tabla 4 se muestran las determinaciones *in situ* de parámetros de calidad en uva realizadas empleando la tecnología NIRS.



Tabla 4. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *in situ*

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (nm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
Acidez (málico + tartárico) (g l <sup>-1</sup> )	Chauchard et al., (2004)	CG	MV y UB	Grano	Red de diodos	Transmitancia	680-1100	371	2-16	1,03 g l <sup>-1</sup>	0,86	-
Acidez titulable (ácido tartárico) (g dm <sup>-3</sup> )	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	71	5,8-28,8	1,48 g dm <sup>-3</sup>	0,66	-
Acidez titulable (ácido tartárico) (g l <sup>-1</sup> )	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano homogeneizado	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	134	5,8-28,8	1,12 (g dm <sup>-3</sup> )	0,72	-
Acidez titulable (ácido tartárico) (g l <sup>-1</sup> )	Menesatti, (2007)	CS, M y SG	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia Interelectancia	400-1100	450	-	0,2 g l <sup>-1</sup>	0,46	-
Antocianos extraíbles pH 3,2 (mg dm <sup>-3</sup> )	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	71	94,5-823,7	81,87 mg dm <sup>-3</sup>	0,45	-
Antocianos potenciales pH 1 (mg dm <sup>-3</sup> )	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano homogeneizado	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	135	94,5-823,7	77,7 mg dm <sup>-3</sup>	0,71	-
Antocianos potenciales pH 1 (mg dm <sup>-3</sup> )	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	71	148,1-1350	133,90 mg dm <sup>-3</sup>	0,50	-
Antocianos potenciales pH 1 (mg dm <sup>-3</sup> )	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano homogeneizado	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	137	148,1-1350	129 mg dm <sup>-3</sup>	0,61	-

C: Carménère; CG: Carñena; CH: Chardonnay; CS: Cabernet Sauvignon; M: Merlot; MV: Mourvèdre; N: Nebbiolo; PN: Pinot Noir; SG: San Giovese; UB: Ugni Blanc.

Tabla 4. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *in situ* (Continuación)

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (nm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
Antocianos potenciales (mg l <sup>-1</sup> )	Menesatti, (2007)	CS, M y SG	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia Interelectancia	400-1100	450	-	101,3 mg l <sup>-1</sup>	0,56	-
Azúcares reductores (g l <sup>-1</sup> )	Menesatti, (2007)	CS, M y SG	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia Interelectancia	400-1100	450	-	8,3 g l <sup>-1</sup>	0,56	-
Antocianos totales (mg g <sup>-1</sup> )	Larraín et al., (2008)	C, CS, M y PN	CH	Grano	Red de diodos	Interactancia	640-1300	> 55	0,01-2,71	0,30 mg g <sup>-1</sup>	0,64	1,3
Poli-fenoles totales (densidad óptica a 280 nm)	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	71	18,1-57,4	4,74 ua	0,46	-
pH	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano homogeneizado	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	127	18,1-57,4	5,81 ua	0,49	-
	Menesatti, (2007)	CS, M y SG	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia Interelectancia	400-1100	450	-	0,1	0,49	-
	Larraín et al., (2008)	C, CS, M y PN	CH	Grano	Red de diodos	Interactancia	640-1300	> 125	1,73-4,11	0,15	0,82	2,2
	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	71	2,6-3,4	0,15	0,66	-
	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano homogeneizado	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	136	2,6-3,4	0,13	0,64	-

C: Carménère; CG: Cariñena; CH: Chardonnay; CS: Cabernet Sauvignon; M: Merlot; MV: Mourvèdre; N: Nebbiolo; PN: Pinot Noir; SG: San Giovese; UB: Ugni Blanc.

Tabla 4. Análisis cuantitativo de uva por Espectroscopía VIS-NIR. Análisis *in situ* (Continuación)

Parámetros	Autores	Variedades de uva		Modo de presentación	Instrumento	Modo de interacción	Región espectral (nm)	Número de muestras	Rango	ETVC/ETP	r <sup>2</sup>	RPD
		Tintas	Blancas									
SST (°Brix)	Herrera et al., (2003)	C y CS	CH	Grano	Red de diodos	Interactancia, Transmitancia	650-1100	> 200	7-30	1,34-2,96 °Brix	0,92-0,98	3,0-4,0
	Larrain et al., (2008)	C, CS, M y PN	CH	Grano	Red de diodos	Interactancia	640-1300	> 150	6,8-29,2	1,24 °Brix	0,93	3,4
	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	71	11,7-24	1,48 °Brix	0,67	-
	Guidetti et al., (2010)	N	-	Grano homogeneizado	Red de diodos	Reflectancia	400-1000	134	11,7-24	0,95 °Brix	0,56	-

C: Carménère; CG: Cariñena; CH: Chardonnay, CS: Cabernet Sauvignon; M: Merlot, MV: Mourvèdre; N: Nebbiolo; PN: Pinot Noir; SG: San Grovese; UB: Ugni Blanc.

En el caso de determinaciones de calidad de uva realizadas *in situ* los instrumentos NIRS empleados son todos ellos de redes de diodos (Herrera et al., 2003; Chauchard et al., 2004, Menesatti, 2007; Larraín et al., 2008; Guidetti et al., 2010) (Tabla 4). Dichos autores concluyen que Vis/NIR puede ser una interesante y rápida herramienta para controlar el seguimiento de maduración o para realizar controles en recepción en bodega, empleando equipos portátiles.

Todos los trabajos realizados *in situ* emplean la región del visible junto con la región NIR (400-1300 nm), siendo la forma de presentación de la muestra al instrumento en la mayoría de los casos en grano, excepto Guidetti et al., (2010) quienes también utilizaron en su estudio grano homogeneizado.

En cuanto al modo de interacción de la muestra al instrumento utilizado en determinaciones *in situ* se han empleado tanto la reflectancia, la interactancia-reflectancia como la transmitancia.

Al igual que para las determinaciones *at-line*, en las determinaciones *in-situ* de calidad de la uva, los parámetros más estudiados han sido el contenido en sólidos solubles totales (Herrera et al., 2003; Larraín et al., 2008; Guidetti et al., 2010) y el pH (Menesatti, 2007; Larraín et al., 2008; Guidetti et al., 2010).

Los mejores resultados para la determinación del contenido en sólidos solubles totales han sido los obtenidos por Herrera et al., (2003), con valores de los estadísticos  $RPD = 4$ ;  $r^2 = 0,98$ . En el caso del pH, los mejores modelos fueron los obtenidos por Larraín et al., (2008) ( $RPD = 2,2$ ;  $r^2 = 0,82$ )

Asimismo, la determinación del contenido en antocianos ha sido llevada a cabo aplicando NIRS *in situ* (Menesatti, 2007; Larraín et al., 2008; Guidetti et al., 2010), permitiendo los modelos obtenidos la clasificación de las muestras como de bajo, medio y alto contenido en antocianos (Williams, 2001).

Por último, señalar que la determinación *in situ* de parámetros de calidad de uva mediante NIRS es de gran importancia para la industria enológica, ya que permitiría el seguimiento de la maduración del fruto en la cepa. El estado de madurez de la uva condiciona totalmente el vino que se quiere obtener y sus características. Por ello es necesario realizar estudios de maduración, siguiendo la evolución en la vida de los componentes de la uva, que aporten información para decidir el momento óptimo de la vendimia.

### **3.8. REFLEXIONES FINALES SOBRE EL ESTADO DE DESARROLLO DEL ANÁLISIS NIRS EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA**

Como ha sido puesto de manifiesto en la revisión bibliográfica realizada, para la industria enológica sería muy interesante el disponer de una técnica de análisis no destructiva, que no requiera preparación alguna de la muestra, respetuosa con el medio ambiente y fiable destinada a la determinación de parámetros en la uva tales como el contenido en sólidos solubles totales (SST) y en azúcares reductores, la acidez titulable y el pH, así como los contenidos en ácidos tartárico, málico y en potasio, con la mayor precisión y empleando el menor tiempo posible, con el fin de realizar actuaciones rápidas tanto sobre la materia prima como sobre el mosto, destinadas a determinar el momento óptimo de cosecha, así como la variedad o la mezcla de variedades más adecuadas, en función de los parámetros de calidad interna seleccionados, para obtener un vino de calidad.

El hecho de conocer los principales parámetros de calidad interna de la uva anteriormente citados, permitiría a la industria enológica el poder realizar las correcciones necesarias en caso de pH altos y valor de acidez titulable bajos, así como correcciones en mostos con bajos contenidos en azúcares adicionando mostos concentrados o mostos concentrados rectificadas, estando todas ellas destinadas a obtener vinos de alta calidad. Sin embargo, los métodos de análisis tradicionales empleados para la determinación de dichos parámetros resultan ser destructivos y tediosos.

La tecnología NIRS ofrece importantes posibilidades para abordar las necesidades analíticas de control y aseguramiento de la calidad de la industria enológica de forma integral, permitiendo la toma de decisiones en tiempo real. Asimismo, es importante tener en consideración que el procesado de la muestra y la presentación de la misma al instrumento son factores importantes en la solidez y la precisión de NIRS como una técnica analítica.

A pesar de que ciertas investigaciones anteriores han demostrado el potencial de la tecnología NIRS para la caracterización cuantitativa de los parámetros de calidad de uva de vinificación, es importante señalar que la inmensa mayoría de los estudios anteriormente citados han sido realizados empleando uva desgranada, mosto o grano homogeneizado, lo que implica un cierto pre-procesado del producto previamente a la presentación del mismo al instrumento, variando la intensidad del mismo en función del tipo de materia prima utilizado. Hecho que va en detrimento de una de las principales ventajas del empleo de NIRS como es la nula preparación de la muestra para su análisis.

Igualmente, el desarrollo instrumental acaecido en los últimos años, donde destacan los instrumentos de redes de diodos sin elementos móviles que ofrecen la posibilidad de adquirir la información espectral de superficies de muestra relativamente grandes en un corto período de tiempo y su aplicación para el análisis en línea, en la recepción en bodega y durante el proceso de elaboración de mostos y vinos, así como el desarrollo de equipos portátiles de tamaño reducido, de diseño manual y que funcionan con baterías como los instrumentos NIRS-MEMS, cuyo diseño óptico y ergonomía abren enormes expectativas para la recogida de datos espectrales *in situ* antes o durante la cosecha, permitiendo así la posibilidad de realizar modelos predictivos destinados a determinar el momento óptimo de la misma, hace necesario el contar con estudios de comparación de instrumentos destinados a determinar la idoneidad de los mismos en función de su aplicación en la industria enológica.

Respecto al método multivariante utilizado para el ajuste de los modelos de predicción, es habitual, para aplicaciones NIRS en uvas y mostos, el empleo de regresión lineal, tipo PLS, existiendo escasas referencias relativas a la aplicación de métodos no lineales.

Por lo tanto, se puede afirmar que si bien durante las últimas décadas se ha producido un incremento de las aplicaciones de NIRS en la industria vitivinícola, el uso de la Espectroscopía NIR en la industria del vino está todavía en sus comienzos y es necesario por lo tanto, seguir investigando y optimizar el uso de esta tecnología en el sector vitivinícola, siendo la realización de medidas sobre racimo uno de los aspectos a desarrollar. Por todo ello, se planteó la presente Tesis Doctoral con los objetivos que han sido descritos en el Capítulo 2 del presente documento.

## **Capítulo 4**





## **Capítulo 4. LA TECNOLOGÍA NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD INTERNA, DETERMINACIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO DE COSECHA Y CONTROL DE CALIDAD Y TRAZABILIDAD EN LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA**

**4.1. 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, 158–165 (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

Virginia González-Caballero<sup>a</sup>, María-Teresa Sánchez<sup>b,\*</sup>, María-Isabel López<sup>a</sup>, Dolores Pérez-Marín<sup>c,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación y Formación Agraria de "Cabra-Priego", Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Cabra, Spain

<sup>b</sup> Department of Bromatology and Food Technology, University of Cordoba, Campus of Rabanales, 14071 Cordoba (Córdoba), Spain

<sup>c</sup> Department of Animal Production, University of Cordoba, Campus Rabanales, 14071 Cordoba, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 October 2009

Received in revised form 22 June 2010

Accepted 23 June 2010

Available online 24 July 2010

#### Keywords:

NIR spectroscopy

Grapes

Quality parameters

Non-destructive analysis

On-vine

Bunch analysis

### ABSTRACT

NIR spectroscopy was used as a non-destructive technique for the assessment of changes in certain internal quality properties of wine grapes (*Vitis vinifera* L.) during on-vine ripening and at harvest. A total of 108 different wine grape samples were used to construct calibration models based on reference data and NIR spectral data, obtained using a commercially-available diode-array spectrophotometer (380–1700 nm). The feasibility of testing bunches of intact grapes was investigated and compared with more traditional methods of presentation, such as berries or must. Predictive models were constructed to quantify changes in soluble solid content (SSC, °Brix), reducing-sugar content (g/l), pH-value, titrable acidity (g/l tartaric acid), tartaric acid (g/l) and malic acid (g/l), these being the major parameters used to chart ripening. NIRS technology provided good precision for the bunch analysis mode assayed for SSC ( $r^2 = 0.89$ ; SECV = 1.41 °Brix), for reducing-sugar content ( $r^2 = 0.87$ ; SECV = 17.13 g/l) and for pH-value ( $r^2 = 0.69$ ; SECV = 0.19). Models developed for testing other fruit acidity parameters yielded results sufficient to provide a screening tool to distinguish between low and high acidity values in intact grapes. Significantly, the results obtained with bunch presentation were similar to those obtained with berries and must, thus justifying further implementation of NIRS technology for the non-destructive analysis of quality properties both during on-vine ripening and on arrival at the winery. This method allows musts to be processed separately depending on initial grape quality, assessed with a single spectrum measurement and in a matter of seconds.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Measurement of certain grape quality parameters – e.g. total soluble solid content (SSC), reducing-sugar content, titrable acidity, pH-value, tartaric acid and malic acid content – is essential for optimum harvest timing and for ensuring the production of high-quality wines that are both chemically and biologically stable (Martínez-Toda, 2007).

However, traditional analytical methods applied to the measurement of these parameters in grapes and wines have proved to be slow, tedious and destructive, and do not match the demands of modern wine production in a global market (Gishen et al., 2000, 2002; Damberg et al., 2003). Nowadays, factors like prompt and

low-cost analysis, together with non-invasive or minimal sample preparation methods, are of paramount importance in the modern wine industry; control systems need to be based on real-time grape classification in terms of selected internal quality parameters, thus making it possible to determine the variety or blend most likely to produce a high-quality wine.

Measurement of the key internal qualities listed above enables the wine industry to adjust high pH and low titrable acidity musts, and to improve musts with low sugar content by adding concentrated musts or pre-adjusted musts, thus ensuring high-quality wines. Accurate grape quality measures enable wineries to stream the fruit for crushing and blending, and to maximize the profitability of their production (Sas, 2008).

Near Infrared Spectroscopy (NIRS) is becoming a more attractive analytical technique for measuring quality parameters in food showing considerable promise for the non-destructive analysis of food products, and is ideally suited to the requirements of the wine industry in terms of both quality control and traceability: it

\* Corresponding author. Tel.: +34 957 212576; fax: +34 957 212000.

\*\* Corresponding author. Tel.: +34 957 212576; fax: +34 957 212000.

E-mail addresses: [teresa.sanchez@uco.es](mailto:teresa.sanchez@uco.es) (M.-T. Sánchez), [pa2pemad@uco.es](mailto:pa2pemad@uco.es) (D. Pérez-Marín).

requires little or no sample preparation; it is both flexible and versatile, i.e., applicable to multiproduct and multicomponent analysis, thus enabling testing of both the raw material and the end product, as well as allowing simultaneous measurement of several analytical parameters; it generates no waste, is less expensive to run than conventional methods – since a single instrument can be used for a wide range of wine grapes and parameters – and can be built into the processing line, enabling large-scale individual analysis and real-time decision making (Roberts et al., 2004; Garrido-Varo and De Pedro, 2007).

Previous research has demonstrated the potential of NIRS technology for the quantitative characterization of wine grape quality parameters such as soluble solid content (Jarén et al., 2001; Dambergers et al., 2003, 2006; Herrera et al., 2003; Arana et al., 2005; Cozzolino et al., 2005; Larraín et al., 2008), reducing-sugar content (Fernández-Novales et al., 2009), pH-value (Dambergers et al., 2003, 2006; Cozzolino et al., 2004, 2005; Larraín et al., 2008) and acidity (Chauchard et al., 2004). However, all these studies have used either grape berries or must, thus requiring a certain amount of processing prior to analysis; they have thus failed to exploit one of the major advantages of NIRS, i.e. that it requires no sample preparation.

Cozzolino et al. (2006) report that, although the number of winemaking applications for which NIRS could be used has increased over the last few years, NIR spectroscopy in the wine industry is still in its infancy. Clearly, more can be done to optimise the use of NIRS sensors in the wine industry; the measurement of quality properties directly on the bunch would in this sense mark a considerable step forward. It would enable not only on-the-vine measurements during ripening – thus facilitating decisions regarding harvest timing – but also rapid measurement of quality parameters as the grapes arrive at the winery, thus speeding up decision-making at that stage and enabling separate processing of batches depending on the initial quality of the raw material, assessed prior to processing.

Sample processing and sample presentation are key factors to be borne in mind if NIRS applications are to be robust and accurate (Brimmer and Hall, 2001; Brimmer et al., 2001).

In recent years, NIRS equipment has undergone radical changes; new-generation instruments and accessories have been developed. The high-speed operation of the diode-array spectrophotometers currently available in the market provides the opportunity to acquire spectral information from relatively large surface areas of sample in a short time, thus enabling their application for on-line analysis (Saranwong and Kawano, 2007).

The aim of this study was to assess the applicability of NIRS technology for measuring major internal quality parameters in wines grapes (soluble solid content, reducing-sugar content, pH-value, titrable acidity, tartaric acid and malic acid content), during ripening and at harvest, and to compare the performance of the calibration models obtained using bunches of intact grapes with those obtained using berries and must.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Grape sampling during ripening

A total of 108 samples of different wine grapes (*Vitis vinifera* L.) (78 white and 30 red) grown under two irrigation regimes (26 samples under regulated deficit irrigation (RDI) and 82 samples under a non-irrigated regime) at the Agricultural Research and Training Center in Cabra, near Córdoba, Spain, were harvested in July, August and September 2006 (Table 1).

Grape samples were collected every 7 days throughout the study. On arrival at the laboratory, grapes were promptly placed

**Table 1**  
Sampling during grape ripening.

	Irrigation regime	
	Regulated deficit irrigation	Non-irrigation
White grape varieties	Pedro Ximénez (19)	Albariño (1) Baladí (2) Doradilla (3) Parellada (2) Gewurztraminer (1) Lairén (2) Macabeo (1) Malvasía (1) Mantuo de Pila (1) Montepila (1) Moscatel (1) Parrellada (1) Pedro Ximénez (38) Vijiriega (1) Zalema (3)
Red grape varieties	Bobal (3) Monastrel (4)	Bobal (5) Cabernet Franc (3) Cabernet Sauvignon (2) Cencibel (1) Garnacha tintorera (2) Graciano (2) Lairén (1) Macabeo (1) Monastrel (5) Pinot noir (1)

Number of samples in brackets.

in refrigerated storage at 0 °C and 95% relative humidity. Prior to each measurement, samples were allowed to stabilize at the laboratory temperature of 25 °C.

### 2.2. Spectra collection

Spectra were collected on all samples in reflectance mode ( $\log 1/R$ ) using the Zeiss CORONA portable diode-array spectrometer (model CORONA 45VIS/NIR, Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, USA).

The instrument was equipped with the turnstep module (revolving plate) and a Petri dish of diameter 20 cm to contain the samples, working in reflectance mode in the spectral range 380–1700 nm, every 2 nm.

Samples were presented to the instrument in three modes. Spectra were first obtained for intact bunches of grapes, and then from the berries comprising these bunches. Berries were then passed through a hand-operated food mincer (LI 240, Sammic, SL, Azpeitia, Guipúzcoa, Spain) which enabled constant pressure to be maintained during juice extraction with minimal seed and skin shearing. The must was then centrifuged at 4000 rpm for 10 min (Centronic 7000577, Selecta, Barcelona, Spain) to remove suspended solids, and the supernatant was used for NIR spectroscopy purposes. A folded-transmission gold reflector cup, diameter 3.75 cm, was used with a pathlength of 0.1 mm.

Eight spectra were captured per sample for each sample presentation mode, and the average of the eight was used in calculations.

For this instrument, the signal was captured using CORA software version 3.2.2 (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, USA), and subsequently pretreated using the Unscrambler program version 9.1 (CAMO, ASA, Oslo, Norway).

### 2.3. Reference data analysis

For each sample, reference data were obtained for soluble solid content (SSC), reducing-sugar content, pH-value, titrable acidity (TA) and tartaric and malic acid contents. Total soluble solids

(°Brix) were measured using an Abbé-type refractometer (model B, Zeiss, Oberkochen, Württemberg, Germany). Reducing-sugar content was measured by titration using an automatic titrator (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, Spain), using a modification of the Rebelein method (Rebelein, 1971). Results were expressed as g/l. Must pH-value and titrable acidity were measured using an automatic titrator (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, Spain); titrable acidity was measured by titration with 0.1 NaOH to an end point of pH-value 7.0. Results were expressed as g/l tartaric acid (OJEU, 2005). Tartaric acid was measured with a spectrophotometer (HP 8452, Hewlett-Packard, Bristol, UK) as previously described by Rebelein (1969), and expressed as g/l tartaric acid. Malic acid was measured using a portable RQflex reflectometer (model 16970, Merck Co., Darmstadt, Germany) using the enzyme method (M.A.P.A., 1993). Results were expressed as g/l malic acid.

#### 2.4. Calibration and validation sets

Calibration models were initially developed using all the samples available ( $n = 108$ ), in order to establish the potentiality of bunch presentation and to compare with those obtained for the traditional models (berries and must) (Table 2).

Following, the best prediction models obtained for bunch presentation were externally validated. For that, the initial sample set was divided in two sets: 88 samples were used for calibration (80%), and 48 for external validation (20%) (Table 3). Samples to be used for both sets were selected solely on the basis of spectral data, following the method proposed by Shenk and Westerhaus (1991) using the CENTER algorithm included in the WinISI II software package version 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).

#### 2.5. Chemometric data treatment

The WinISI II software package version 1.50 was used for the chemometric treatment of data (ISI, 2000).

Quantitative calibrations were developed for predicting soluble solid content, reducing-sugar content, pH-value, titrable acidity, tartaric acid and malic acid contents in bunches and compared with those obtained for berries and must.

Prediction equations were obtained using the Modified Partial Least Squares (MPLS) regression method (Shenk and Westerhaus, 1995a). Partial least squares (PLS) regression is similar to principal component regression (PCR), but uses both reference data (chemical, physical, etc.) and spectral information to identify the factors useful for fitting (Martens and Naes, 1989). MPLS is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS, the NIR residuals at each wavelength, obtained after each factor is calculated, are standardized (divided by the standard deviations of the residuals at a wavelength) before calculating the next factor. When developing MPLS equations, cross-validation is recommended to select the optimal number of factors and to avoid overfitting (Shenk and Westerhaus, 1995a). For cross-validation, the calibration set was partitioned into four groups; each group was then validated using a calibration developed on the other samples; finally, validation errors were combined to obtain a standard error of cross-validation (SECV).

All multivariate regression equations were obtained using the Standard Normal Variate and Detrending methods for scatter correction (Barnes et al., 1989). Moreover, four derivate mathematical treatments were tested in the development of NIRS calibrations: 1, 5, 5, 1; 2, 5, 5, 1; 1, 10, 5, 1 and 2, 10, 5, 1 (Shenk and Westerhaus, 1995b).

The following spectral regions were tested for calibration purposes on the instrument: 380–1650 nm (the higher spectral range with useful information covering the VIS + NIR regions); 780–

1650 nm (higher spectral range covering the NIR region and including the very near-infrared region) and 1100–1650 nm (including only the strict near-infrared region). In order to eliminate noise at the end of the spectral range, the region between 1650 and 1700 nm was discarded.

The statistics used to select the best equations were: standard error of calibration (SEC), coefficient of determination of calibration ( $R^2$ ), standard error of cross-validation (SECV), coefficient of determination for cross-validation ( $r^2$ ), RPD or ratio of the standard deviation of the original data (SD) to SECV, and the coefficient of variation (CV) or ratio between the SECV and the mean value of the reference data of the studied parameter for the training set. This statistic enables SECV to be standardized, facilitating the comparison of the results obtained with sets of different means (Williams, 2001).

The best-fitting equations obtained for the calibration set ( $n = 88$ ), as selected by statistical criteria, were subsequently evaluated by external validation, a procedure determining the predictive ability of an equation based on a sample set which has not been used in the calibration procedures. This statistical process is based on the determination of a known significant error, termed “bias”, and an unexplained significant error, termed  $SEP_{(c)}$  (standard error of performance, bias-corrected) (Windham et al., 1989).

Generally, for calibration groups comprising more than 100, and validation groups containing 9 or more samples, the following control limits are assumed (Shenk et al., 1989; Shenk and Westerhaus, 1996):

$$\begin{aligned} \text{Limit Control } SEP_{(c)} &= 1.30 \times \text{SEC (standard error of calibration).} \\ \text{Limit Control bias} &= \pm 0.60 \times \text{SEC (standard error of calibration).} \end{aligned}$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Spectral features

Typical  $\log(1/R)$  spectra for bunches and berries, together with the most relevant absorption bands, are shown in Fig. 1. In the spectral region studied, spectra for bunches and berries displayed very similar behavior. The effect of derivatives was most apparent with the first derivative of a spectrum, which was able to separate overlapping absorption bands, displaying more clearly certain characteristic absorbance peaks.

For bunches and berry samples, three peaks were identified in the visible region of the spectrum, at 430, 494 and 676 nm, respectively; these are indicative of the presence of red pigments (carotenoids and anthocyanins) and of abundant chlorophyll a and b (Strayer, 1995; McGlone and Kawano, 1998; McGlone et al., 2002).

In the near-infrared region, the spectrum was dominated by a sugar-related absorption band at around 1200 nm region (Williams, 2001). Water-related absorption bands were also found at around 950 and 1460 nm, which are related to the third overtone of O–H, as is usually the case for fruits and vegetables, particularly grapes which 70–80% water (Murray, 1987; McGlone and Kawano, 1998; Williams, 2001).

#### 3.2. Population characterization

Statistical analysis of calibration sample sets, i.e., data ranges, means and standard deviations (SD) and coefficients of variation (CV) are shown in Tables 2 and 3. Samples were collected over the critical months to check for SSC (15.3–58.6 °Brix), for titrable acidity (0.2–11.7 g/l tartaric acid) and for tartaric acid (4.9–15.5 g/l tartaric acid) variations in the berry.

A key feature of the sample set is that it contained data from wine grapes sampled at different stages of ripening; this would account for the high coefficient of variation (CV) values recorded,

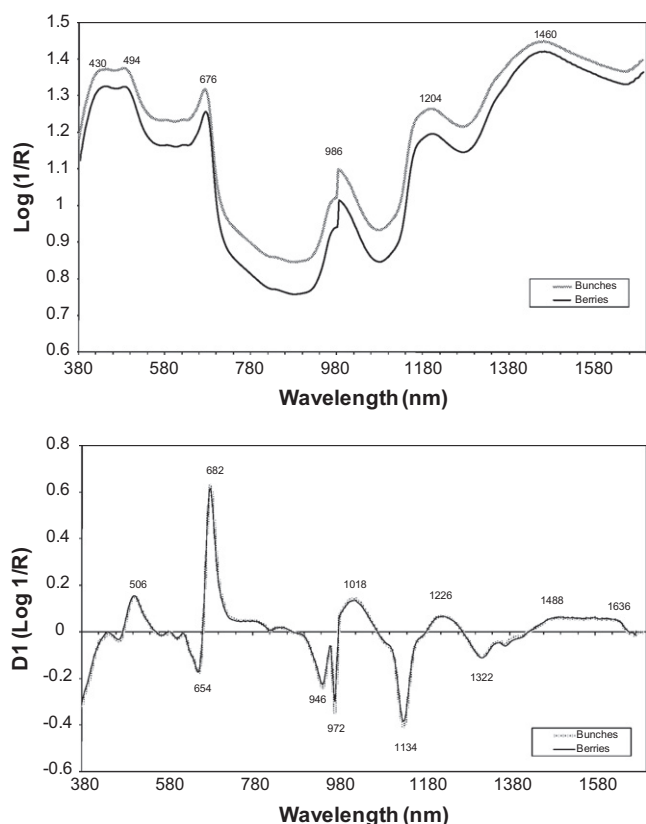


Fig. 1. Typical  $\log(1/R)$  and  $D1 \log(1/T)$  spectra for grape bunches and berries.

Table 2

Statistical analysis of calibration sample sets, i.e., data ranges, means and standard deviations (SD) and coefficients of variation (CV).

Parameter	Item				
	Number	Range	Mean	Standard deviation	CV (%)
Soluble solid content ( $^{\circ}$ Brix)	108	15.30–58.60	23.86	7.46	31.29
Reducing-sugar content (g/l)	108	126.50–586.40	238.69	75.11	31.47
pH-value	108	2.90–4.60	3.54	0.34	9.51
Titrate acidity (g/l tartaric acid)	108	0.20–11.70	4.75	1.56	32.94
Tartaric acid (g/l tartaric acid)	108	4.90–15.50	7.53	1.65	21.97
Malic acid (g/l malic acid)	108	0.10–7.20	0.84	0.95	112.53

particularly for soluble solid content, reducing-sugar content, titrate acidity, tartaric acid and malic acid contents.

The broad range of values recorded for SSC (15.30–58.60  $^{\circ}$ Brix) was due to the fact that sampling was carried out throughout ripening, which is characterized, amongst other things, by accumulation of sugars in the grape (López et al., 2007). The highest values were found for over-ripe samples which were over-ripe and were to be used for drying into raisins.

Variations in acidity-related parameters (titrate acidity, tartaric and malic acid content) were due to a decline in grape acidity during ripening, as a result of the consumption of these two predominant acids during fruit respiration (Peynaud, 1996).

It should be stressed that tartaric acid content varied within narrow limits. Absolute content underwent virtually no change

Table 3

Statistical analysis of the calibration and prediction sample sets, i.e., data range, mean and standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV).

Parameter	Item	Calibration set (n = 88)	Validation set (n = 20)
Soluble solid content ( $^{\circ}$ Brix)	Range	15.30–58.60	16.40–25.90
	Mean	24.66	20.53
	SD	8.00	2.33
	CV (%)	32.44	11.34
Reducing-sugar content (g/l)	Range	126.50–586.40	156.1–269.0
	Mean	246.80	203.31
	SD	79.58	27.7
	CV (%)	32.24	13.62
pH-value	Range	2.90–4.60	2.90–3.80
	Mean	3.58	3.39
	SD	0.34	0.27
	CV (%)	9.45	7.96
Titrate acidity (g/l tartaric acid)	Range	0.20–11.70	3.50–9.70
	Mean	4.55	5.45
	SD	1.43	1.84
	CV (%)	31.53	33.76
Tartaric acid (g/l tartaric acid)	Range	4.90–15.50	6.00–12.20
	Mean	7.39	8.00
	SD	1.62	1.76
	CV (%)	21.91	22.00
Malic acid (g/l malic acid)	Range	0.10–7.20	0.30–2.00
	Mean	0.85	0.78
	SD	1.04	0.44
	CV (%)	122.35	56.41

during ripening, although concentrations declined as the grape gained weight. At the end of ripening, tartaric acid content may diminish due to combustion and precipitation as potassium bitartrate (Alexiandre and Álvarez, 2003).

By contrast, malic acid levels fell steadily throughout ripening, displaying a more marked decline when external temperatures were higher (López et al., 2009). The lowest values for malic acid were therefore recorded at the end of ripening, and the highest values were found in the initial samples.

### 3.3. Calibration development

#### 3.3.1. Sweetness-related parameters

The best calibration models obtained using the global set (n = 108) for the prediction of SSC and reducing-sugar content according to the spectral range and derivate treatment used, for bunches, berries and musts are shown in Table 4.

The equation displaying the greatest predictive capacity for SSC in bunches was that obtained over the broadest spectral range, i.e., 380–1650 nm, with statistical values of  $r^2 = 0.89$ , SECV = 1.41  $^{\circ}$ Brix and RPD = 2.92. The predictive capacity of this equation was higher to that of the equation obtained with grape must (RPD = 2.64) and lower than that recorded using berries (RPD = 3.34). Results for berries were similar to findings reported by Larraín et al. (2008):  $r^2 = 0.91$ , RMSEP = 1.24  $^{\circ}$ Brix and RPD = 3.40.

It should be stressed that although the statistics obtained using “bunch analysis” were similar to those recorded using traditional NIRS presentation modes (berries and must), the overall equation presented a coefficient of determination (0.89) that enabled samples to be classed with total accuracy due to the excellence predictive capacity of the model (Williams, 2001). This was achieved using a rapid, non-destructive sensor, and with no need for sample processing, thus providing the wine industry with an instant response and enabling grape harvesting to be started at the optimum time, as well as allowing musts to be processed selectively depending on raw material characteristics assessed without prior processing.

**Table 4**  
Calibration statistics for the equations obtained for predicting soluble solid content (SSC) and reducing-sugar content for the different sample presentations and spectral ranges studied (calibration set,  $n = 108$  samples).

Parameter	Sample presentation	Spectral range (nm)	Mathematic treatment	Mean <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	SEC <sup>c</sup>	R <sup>2d</sup>	SECV <sup>e</sup>	r <sup>2f</sup>	RPD <sup>g</sup>	CV (%) <sup>h</sup>
SSC (°Brix)	Bunch	380–1650	2, 10, 5, 1	22.42	4.12	1.03	0.94	1.41	0.89	2.92	6.29 <sup>i</sup>
		780–1650	2, 5, 5, 1	22.51	3.83	1.03	0.93	1.52	0.85	2.53	6.73
		1100–1650	1, 10, 5, 1	23.44	7.27	1.90	0.93	2.29	0.90	3.18	9.75
	Berry Must	1100–1650	1, 10, 5, 1	22.66	4.77	1.07	0.95	1.43	0.91	3.34	6.31 <sup>j</sup>
		380–1650	1, 5, 5, 1	22.81	4.81	1.26	0.93	1.82	0.86	2.64	7.98 <sup>i</sup>
		780–1650	2, 5, 5, 1	227.09	50.90	14.52	0.92	19.97	0.85	2.55	8.79
Reducing-sugar content (g/l)	Bunch	380–1650	2, 5, 5, 1	223.41	47.38	11.76	0.94	17.13	0.87	2.77	7.67 <sup>i</sup>
		780–1650	1, 5, 5, 1	222.69	47.62	11.38	0.94	18.95	0.84	2.51	8.51
		1100–1650	2, 10, 5, 1	221.69	51.17	9.16	0.97	13.10	0.93	3.91	5.91 <sup>j</sup>
	Berry Must	1100–1650	2, 10, 5, 1	227.73	50.93	21.20	0.83	26.39	0.73	1.93	11.59 <sup>j</sup>
		380–1650	1, 5, 5, 1								
		780–1650	2, 5, 5, 1								

<sup>a</sup> Mean of the calibration set.

<sup>b</sup> Standard deviation.

<sup>c</sup> Standard error of calibration.

<sup>d</sup> Coefficient of determination of calibration.

<sup>e</sup> Standard error of cross-validation.

<sup>f</sup> Coefficient of determination of cross-validation.

<sup>g</sup> Ratio SD/SECV.

<sup>h</sup> Coefficient of variation.

<sup>i</sup> Best equation.

<sup>j</sup> The best of the best equations for each sample presentation.

For reducing-sugar content, the equation displaying the greatest predictive capacity in bunches was obtained over the range 780–1650 nm, yielding statistical values of  $r^2 = 0.87$ , SECV = 17.13 g/l and RPD = 2.77, i.e., lower to those obtained for berry samples ( $r^2 = 0.93$ , SECV = 13.10 g/l and RPD = 3.91) and higher to those obtained for must samples ( $r^2 = 0.73$ , SECV = 26.39 g/l and RPD = 1.93).

No published studies address the direct measurement of reducing-sugar content in grapes. Fernández-Novales et al. (2009) reported a greater predictive capacity in musts ( $r^2 = 0.98$ , SECV = 13.62 g/l and RPD = 6.57), although their results are not wholly comparable, since they used a set comprising not only recently-pressed grape musts – as was the case here – but also fermenting musts and finished wines, and thus were able to use a more varied calibration set.

### 3.3.2. Acidity-related parameters

For pH-value, the best statistics ( $r^2 = 0.69$ , SECV = 0.19 and RPD = 1.81) for bunch analysis were obtained with the second derivative treatment (math treatment 2, 10, 5, 1) in the spectral range 380–1650 nm (Table 5). The value obtained for  $r^2$  (0.69) would, according to the guidelines indicated by Williams (2001), enable the classification of musts obtained from these grapes into three categories (high, medium and low pH-value), thus allowing musts to be adjusted prior to fermentation.

Interestingly, bunch analysis yielded better results than the other presentation modes for pH-value (RPD = 1.81), followed by berry analysis (RPD = 1.66), and finally must analysis (RPD = 1.43).

The results obtained using bunch analysis, though more complex and less uniform, matched those reported by Cozzolino et al. (2004) ( $r^2 = 0.72$ , RMSECV = 0.068 and RPD = 1.4) in the spectral range 700–1100 nm, and by Larraín et al. (2008) ( $r^2 = 0.74$ , RMSEP = 0.15 and RPD = 2.2) working in the spectral range 640–1300 nm, in both cases with berries.

This study also measured other acidity-related parameters: titrable acidity, tartaric acid and malic acid content. The results are shown in Table 5. Measurement of acidity-related parameters in intact fruit is notoriously difficult (Flores et al., 2009); nonetheless, the models developed for these three parameters suggested that NIRS technology may be used for screening purposes, to distinguish between low and high acidity, as indicated by the values

obtained for the determination coefficient ( $r^2 = 0.45$  for titrable acidity;  $r^2 = 0.49$  for tartaric and malic acids) (Williams, 2001). It is also important to note that the best equations for titrable acidity ( $r^2 = 0.45$  and SECV = 1.16 g/l) and tartaric acid content ( $r^2 = 0.49$  and SECV = 1.20 g/l) were obtained using bunch analysis rather than the other presentation modes. Although better results were obtained for malic acid content using berry analysis ( $r^2 = 0.49$  and SECV = 0.68 g/l), the statistics obtained for bunch analysis indicated a similar predictive capacity ( $r^2 = 0.41$  and SECV = 0.74 g/l). Other authors measured total acidity (as the sum of tartaric and malic acid contents) in red grape berries using a non-linear approach and obtained higher predictive ability ( $r^2 = 0.77$  and SECV = 1.30 g/l) (Chauchard et al., 2004).

### 3.4. External validation

The aim was, in the first instance, to validate the best calibration models using a sample set not included in the calibration, but similar to the calibration set. Validations of the best calibration models obtained were performed using sets comprising 20 samples (Table 3). Although several authors have reported that the SECV gives a realistic estimate of the error prediction of samples not included in the calibration (Meuret et al., 1993; Shenk and Westerhaus, 1996; Martens and Dardenne, 1998), this step is recommended to obtain an independent measurement of the equation's accuracy, expressed as SEP, i.e., standard error of performance (Windham et al., 1989).

Only the calibrations that showed a predictive ability that could be considered as good were externally validated, i.e., those calibrations developed for the prediction of SSC, reducing sugars and pH (Table 6). For the rest of parameters related to acidity and due to the lower values of the statistics obtained, it was not considered appropriate at their development status, their validation.

On examining Table 6, it can be observed that the values obtained for the statistics SECV and SEP are very similar for the three parameters studied, which confirms that it is correct to use the SECV as an estimator of the SEP. This aspect is especially important when it is a case of obtaining calibration equations from groups with a reduced number of samples, which it does apply to the present case, as small number of samples are involved in the calibration and validation of equations. Moreover, using the monitoring



**Table 5**

Calibration statistics for the equations obtained for predicting pH-value, titrable acidity, tartaric acid and malic acid contents for the different sample presentations and spectral ranges studied (calibration set  $n = 108$  samples).

Parameter	Sample presentation	Spectral range (nm)	Mathematic treatment	Mean <sup>a</sup>	SD <sup>b</sup>	SEC <sup>c</sup>	R <sup>2d</sup>	SECV <sup>e</sup>	r <sup>2f</sup>	RPD <sup>g</sup>	CV (%) <sup>h</sup>
pH-value	Bunch	380–1650	2, 10, 5, 1	3.54	0.34	0.15	0.78	0.19	0.69	1.81	5.26 <sup>i</sup>
		780–1650	2, 10, 5, 1	3.54	0.34	0.17	0.75	0.19	0.68	1.77	5.38
		1100–1650	1, 10, 5, 1	3.54	0.34	0.19	0.66	0.21	0.63	1.63	5.81
	Berry Must	380–1650	1, 5, 5, 1	3.54	0.34	0.19	0.68	0.20	0.64	1.66	5.75 <sup>j</sup>
		780–1650	1, 10, 5, 1	3.54	0.34	0.22	0.57	0.24	0.49	1.43	6.66 <sup>j</sup>
Titrable acidity (g/l tartaric acid)	Bunch	380–1650	1, 5, 5, 1	4.75	1.56	0.96	0.62	1.16	0.45	1.35	24.63 <sup>i</sup>
		780–1650	1, 10, 5, 1	4.75	1.56	1.05	0.54	1.21	0.40	1.29	25.65
		1100–1650	1, 10, 5, 1	4.75	1.56	1.12	0.48	1.28	0.32	1.35	27.21
	Berry Must	380–1650	1, 5, 5, 1	4.75	1.56	1.18	0.43	1.29	0.33	1.21	27.16 <sup>j</sup>
		780–1650	1, 5, 5, 1	4.75	1.56	1.22	0.20	1.26	0.18	1.24	26.81 <sup>j</sup>
Tartaric acid (g/l tartaric acid)	Bunch	380–1650	2, 10, 5, 1	7.53	1.65	0.97	0.66	1.20	0.49	1.38	16.02 <sup>i</sup>
		780–1650	2, 10, 5, 1	7.53	1.65	1.04	0.60	1.22	0.47	1.36	16.26
		1100–1650	1, 5, 5, 1	7.53	1.65	1.11	0.55	1.31	0.39	1.26	17.52
	Berry Must	380–1650	2, 10, 5, 1	7.53	1.65	1.02	0.62	1.34	0.34	1.23	17.85 <sup>j</sup>
		1100–1650	2, 10, 5, 1	7.53	1.65	1.38	0.02	1.389	0.01	1.19	18.83 <sup>j</sup>
Malic acid (g/l malic acid)	Bunch	380–1650	2, 5, 5, 1	0.84	0.95	0.51	0.71	0.74	0.41	1.28	88.42 <sup>j</sup>
		780–1650	2, 5, 5, 1	0.84	0.95	0.65	0.53	0.80	0.31	1.19	95.45
		1100–1650	2, 5, 5, 1	0.84	0.95	0.72	0.43	0.85	0.21	1.11	101.92
	Berry Must	380–1650	2, 5, 5, 1	0.84	0.95	0.44	0.79	0.68	0.49	1.40	80.18 <sup>i</sup>
		1100–1650	2, 5, 5, 1	0.84	0.95	0.46	0.77	0.72	0.46	1.32	80.17 <sup>j</sup>

<sup>a</sup> Mean of the calibration set.

<sup>b</sup> Standard deviation.

<sup>c</sup> Standard error of calibration.

<sup>d</sup> Coefficient of determination of calibration.

<sup>e</sup> Standard error of cross-validation.

<sup>f</sup> Coefficient of determination of cross-validation.

<sup>g</sup> Ratio SD/SECV.

<sup>h</sup> Coefficient of variation.

<sup>i</sup> The best of the best equations for each sample presentation.

<sup>j</sup> Best equation.

**Table 6**

Main calibration and validation statistics and control limits for predicting soluble solid content (SSC), reducing-sugar content and pH.

Parameter	Sample presentation	Calibration				Prediction				Control limits	
		R <sup>2a</sup>	SEC <sup>b</sup>	r <sup>2c</sup>	SECV <sup>d</sup>	r <sup>2e</sup>	SEP <sup>f</sup>	SEP <sub>(c)</sub> <sup>g</sup>	Bias	SEP <sub>(c)</sub>	Bias
SSC (°Brix)	Bunch	0.96	1.04	0.91	1.53	0.57	1.63	1.69	0.05	1.35	±0.62
Reducing-sugar content (g/l)	Bunch	0.93	12.96	0.87	17.40	0.61	17.94	17.69	-5.36	16.85	±7.78
pH-value	Bunch	0.90	0.10	0.79	0.15	0.51	0.19	0.19	-0.01	0.13	±0.06

<sup>a</sup> Coefficient of determination of calibration.

<sup>b</sup> Standard error of calibration.

<sup>c</sup> Coefficient of determination of cross-validation.

<sup>d</sup> Standard error of cross-validation.

<sup>e</sup> Coefficient of determination of prediction.

<sup>f</sup> Standard error of prediction.

<sup>g</sup> Standard error of prediction bias-corrected.

procedure proposed by Shenk et al. (1989), for the three quality parameters studied, it is important to emphasize that the SEP<sub>(c)</sub> values are close to the confidence limits and the bias are below the confidence limits, showing that the three NIRS equations can be considered as a first trial to develop accurate predictions using the bunch as sample presentation mode.

### 3.5. Effective wavelengths for predicting soluble solid content, reducing-sugar content and pH-value

The loading plots corresponding to the best models obtained for predicting soluble solid content, reducing-sugar content and pH-value are shown in Fig. 2. These plots show the areas across the spectral range where variance has influenced computing of the model to a greater or lesser degree, and the direction (positive or negative).

For the prediction of soluble solid content in grapes, representation of the four latent variables (LV) used in constructing the calibration equation shows that the areas of the spectrum exerting greatest weight on model fitting were 728, 948, 976, 1138 and 1384 nm, related to the absorption of glucids and water (Fig. 2). The absorption around 948 nm was also relevant for reducing-sugar content (Fernández-Novales et al., 2008), while 976 nm was related to the second overtone of O–H in sugars (Osborne et al., 1993).

For the prediction of reducing-sugar content, the wavelengths exerting greatest weight were 720, 948, 982, 1034, 1138, 1284 and 1384 nm, also associated with glucid and water absorption; their influence was either positive or negative, depending on the latent variable in question. The wavelength at around 950 nm was relevant for measuring reducing-sugar content, as reported by Fernández-Novales et al. (2008, 2009). Absorption at around 960 nm was also related to the third overtone of O–H of water

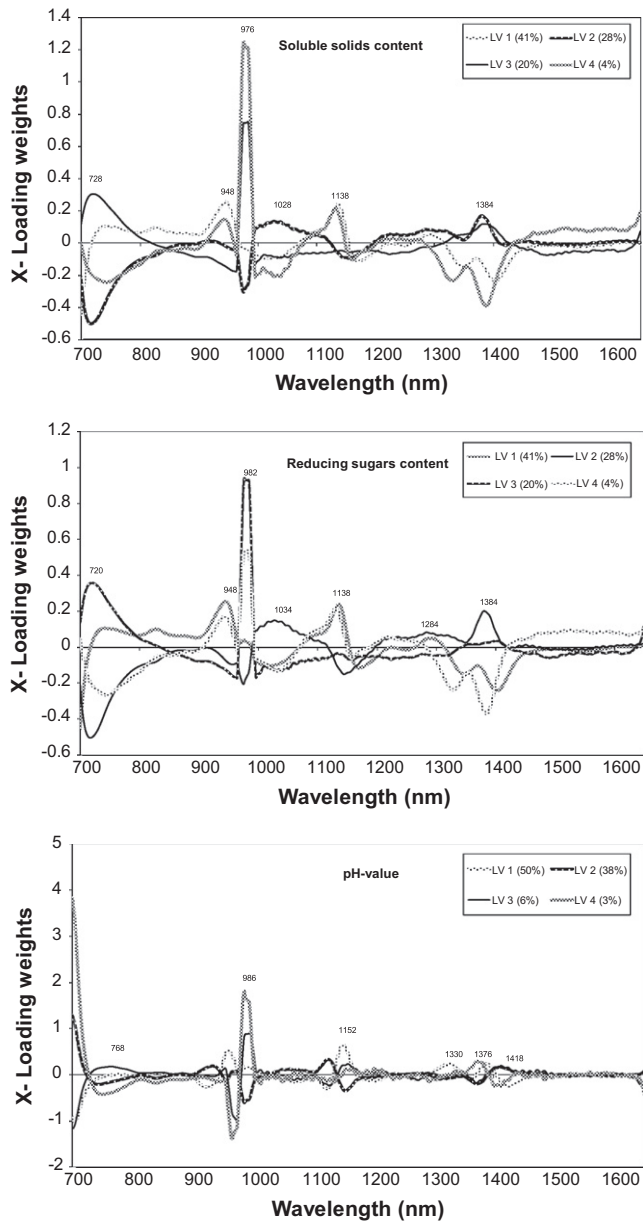


Fig. 2. X-Loading weights for soluble solid content and reducing-sugar content in berries and for pH-value in bunches.

(Williams, 2001), and the absorption at around 975 nm with soluble solid content (Shao and He, 2007).

For the prediction of pH-value, the wavelengths exerting greatest weight were 768 nm, associated with C–H stretch fourth overtones, 986 nm associated to the second overtone of O–H in sugars, 1152 nm associated with C–H second overtones, and 1330, 1376 and 1418 nm associated with water absorption (Osborne et al., 1993).

#### 4. Conclusions

These results suggest that NIRS is a very promising and useful sensor for the non-destructive quantification of chemical changes taking place during on-vine ripening, and for deciding on the optimum time for harvesting.

It must be highlighted that the results obtained here with the analysis of grapes in bunch form, requiring no previous sample preparation, should be considered a first step in the tuning of NIRS

technology for on-site and on-line control purposes, since it is the form in which the grape grows, and in which it arrives at the winery. Application of NIRS will enable increased sampling of each batch produced, thus ensuring a more precise and accurate guarantee of specific quality. As a result, rapid decisions can be taken regarding the optimum harvesting time, and fruit arriving at the winery can be swiftly streamed, allowing batches to be processed separately depending on initial grape quality.

#### References

- Alexandre, J.L., Álvarez, I., 2003. *Tecnología Enológica*. Síntesis, Madrid, España.
- Arana, I., Jarén, C., Arazuri, S., 2005. Maturity, variety and origin determination in white grapes (*Vitis vinifera* L.) using NIRS. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13, 349–357.
- 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, 772–777.
- Brimmer, P.J., Hall, J.W., 2001. Method development and implementation of Near-Infrared Spectroscopy in industrial manufacturing support laboratories. In: Williams, P., Norris, K. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, second ed. American Association of Cereal Chemist, Minnesota, USA, pp. 187–198.
- Brimmer, P.J., DeThomas, F.A., Hall, J.W., 2001. Method 370 development and implementation of Near-Infrared Spectroscopy in industrial manufacturing processes. In: Williams, P., Norris, K. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, second ed. American Association of Cereal Chemist, Minnesota, USA, pp. 199–214.
- Chauchard, F., Codgill, R., Roussel, S., Roger, J.M., Bellon-Meurel, V., 2004. Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 71, 141–150.
- Cozzolino, D., Esler, M.B., Damberg, R.G., Cynkar, W.U., Boehm, D.R., Francis, I.L., Gishen, M., 2004. Prediction of color and pH in grapes using a diode array spectrophotometer (400–1100 nm). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 12, 105–111.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Janik, L., Gishen, M., 2005. Effect of both homogenisation and storage on the spectra of red grapes and on the measurement of total anthocyanins, total soluble solids and pH by visual near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13, 213–223.
- Cozzolino, D., Damberg, R.G., Janik, L., Cynkar, W.U., Gishen, M., 2006. Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14, 279–289.
- Damberg, R.G., Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Kambouris, A., Francis, I.L., Høj, P.B., Gishen, M., 2003. The use of near infrared spectroscopy for grape quality measurement. *Australian Grapegrower and Winemaker* 476, 69–76.
- Damberg, R.G., Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Janik, L., Gishen, M., 2006. The determination of red grape quality parameters using the LOCAL algorithm. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14, 71–79.
- Fernández-Novales, J., López, M.I., Sánchez, M.T., García, J.A., Morales, J.A., 2008. A feasibility study on the use of a miniature fiber optic NIR spectrometer for the prediction of volumic mass and reducing sugar content in white wine fermentations. *Journal of Food Engineering* 89, 325–329.
- Fernández-Novales, J., López, M.I., Sánchez, M.T., Morales, J., González-Caballero, V., 2009. Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking and aging of white and red wines. *Food Research International* 42, 285–291.
- Flores, K., Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D.C., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., 2009. Feasibility in NIRS instruments for predicting internal quality in intact tomato. *Journal of Food Engineering* 91, 311–318.
- Garrido-Varo, A., De Pedro, E., 2007. The role of Near-Infrared Spectroscopy in verifying label information in agro-forestry. In: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Spectroscopy Analysis*, third ed., Practical Spectroscopy Series, vol. 35 CRC Press, USA, pp. 387–398.
- Gishen, M., Damberg, R.G., Kambouris, A., Kwiatkowski, M., Cynkar, W.U., Høj, P.B., 2000. Application of near infrared spectroscopy for quality assessment of grapes, wine and spirits. In: Davies, A.M.C., Giangiacomo, R. (Eds.), *Proceedings of the Ninth International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. NIR Publications, Chichester, UK, pp. 917–920.
- Gishen, M., Iland, P.G., Damberg, R.G., Esler, M.B., Francis, I.L., Kambouris, A., 2002. Objective measures of grape and wine quality. In: Blair, R.J., Williams, P.J., Høj, P.B. (Eds.), *Proceedings of the 11th Australian Wine Industry Technical Conference*. The Australian Wine Research Institute, Urrbrae, SA, Australia, pp. 188–194.
- Herrera, J., Guesalaga, A., Agosin, E., 2003. Shortwave-near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes. *Measurement Science and Technology* 14, 689–697.
- ISI, 2000. *The Complete Software Solution Using a Single Screen for Routine Analysis, Robust Calibrations and Networking*. Manual, FOSS NIRSystems/TECATOR. Infrasoft International, LLC, Silver Spring, MD.
- Jarén, C., Ortuño, J.C., Arazuri, S., Arana, J.I., Salvadores, M.C., 2001. Sugar determination in grapes using NIR technology. *International Journal of Infrared and Millimeter Waves* 22, 1521–1530.

- 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, 294–302.
- López, M.I., Sánchez, M.T., Díaz, A., Ramírez, P., Morales, J., 2007. Influence of a deficit irrigation regime during ripening on berry composition in grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in semiarid areas. *International Journal of Food Science and Nutrition* 58, 491–507.
- López, M.I., Sánchez, M.T., Ramírez, P., Morales, J., 2009. Effect of a deficit irrigation regime on the quality of wines made from white grapes (*Vitis vinifera* L.) grown in semiarid areas. *Journal of Food Quality* 32, 481–503.
- M.A.P.A. (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), 1993. Official Methods for the Analysis of Wines. Secretaría General de Alimentación, vol. II. Dirección General de Política Alimentaria, Madrid, España. pp. 35–319.
- Martens, H.A., Dardenne, P., 1998. Validation and verification of regression in small data sets. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44, 99–121.
- Martens, H., Naes, T., 1989. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Martínez-Toda, F., 2007. Claves de la Viticultura de Calidad: Nuevas Técnicas de Estimación y Control de la Calidad de la Uva en el Viñedo. Mundi-Prensa Libros S.A., Madrid, España.
- McGlone, V.A., Kawano, S., 1998. Firmness, dry matter and soluble solids assessment of postharvest kiwifruit by NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 13, 131–141.
- McGlone, V.A., Jordan, R.B., Martinsen, P.J., 2002. Vis/NIR estimation at harvest of pre and post-storage quality indices for “Royal Gala” apple. *Postharvest Biology and Technology* 25, 135–144.
- Meuret, M., Dardenne, P., Biston, R., Poty, O., 1993. The use of NIR in predicting nutritive value of Mediterranean tree and shrub foliage. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 1, 45–54.
- Murray, I., 1987. The NIR spectra of homologous series of organic compounds. In: Hollow, J., Kaffka, K.J., Gonczy, J.L. (Eds.), *Near Infrared Diffuse Reflectance/Transmittance Spectroscopy*. Proceedings of the International NIR/NIT Conference, Akademiai Kiado, Budapest, pp. 13–28.
- Official Journal of the European Union (OJEU), 2005. Commission Regulation (EC) No. 1293/2005 of 5 August 2005 Amending Regulation (EEC) No. 2676/90 determining Community Methods for the Analysis of Wines. *Official Journal L* 205, 6 of August, pp. 12–15.
- Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H., 1993. Practical NIR spectroscopy with applications. In: Osborne, B.G., Fearn, T., Hindle, P.H. (Eds.), *Food and Beverage Analysis*. Longman, Essex, UK, pp. 11–35.
- Peynaud, E., 1996. *Enología Práctica. Conocimientos y Elaboración del Vino*. Mundi-Prensa Libros S.A., Madrid, España.
- Rebelein, H., 1969. Dosage rapide de l'acide tartrique. *Office International de la Vigne et du Vin, Feuille Vert*. 431.
- Rebelein, H., 1971. Correction de l'acidité des moûts et des vins. *Bulletin de l'OIV* 480 (44), 136–141.
- Roberts, C.A., Stuth, J., Flinn, P., 2004. Analysis of forages and feedingstuffs. In: Roberts, C.A., Workman, J., Reeves, J.B., III (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. ASA, CSSA y SSSA Inc., Madison, WI, USA, pp. 231–267.
- Saranwong, S., Kawano, S., 2007. Applications to agricultural and marine products: fruits and vegetables. In: Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A.A. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, pp. 219–242.
- Sas, A., 2008. The missing gap: measuring and paying for grape quality. In: Blair, R., Williams, P., Pretorius, S. (Eds.), *Proceedings of the 13th Australian Wine Industry Technical Conference*. The Australian Wine Research Institute, Urrbrae, SA, Australia, pp. 52–55.
- Shao, Y., He, Y., 2007. Nondestructive measurement of the internal quality of bayberry juice using Vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering* 79, 1015–1019.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1991. Population definition sample selection and calibration procedures for near infrared spectra and modified partial least squares regression. *Crop Science* 31, 469–474.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1995a. *Analysis of Agricultural and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. NIRSystems, Silver Spring, MD.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1995b. *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*. NIRSystem, Silver Spring, MD.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., 1996. Calibration the ISI way. In: Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp. 198–202.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., Abrams, S.M., 1989. Protocol for NIR calibrations: monitoring analysis results and recalibration. In: Martens, G.C., Shenk, J.S., Barton, F.E., II (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*, Agriculture Handbook, vol. 643. USDA-ARS, US Government Printing Office, Washington, DC, pp. 104–110.
- Strayer, L., 1995. *Biochemistry*, fourth ed. W.H. Freeman and Company/Worth Publishers, New York, USA.
- Williams, P.C., 2001. Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P.C., Norris, K.H. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. AACC Inc., St. Paul, Minnesota, pp. 145–169.
- Windham, W.R., Mertens, D.R., Barton II, F.E., 1989. Protocol for NIRS calibration: sample selection and equation development and validation. In: Martens, G.C., Shenk, J.S., Barton, F.E., II (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*, Agriculture Handbook, vol. 643. USDA-ARS, US Government Printing Office, Washington, DC, pp. 96–103.

**4.2. EVALUATION OF DIFFERENT REGRESSION STRATEGIES FOR  
INTERNAL QUALITY CONTROL OF GRAPE BUNCHES DURING ON-VINE  
RIPENING. SENSORS 11, 6109-6124 (2011)**



Article

## Optimization of NIR Spectral Data Management for Quality Control of Grape Bunches during On-Vine Ripening

Virginia González-Caballero <sup>1</sup>, Dolores Pérez-Marín <sup>2,\*</sup>, María-Isabel López <sup>1</sup> and María-Teresa Sánchez <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Formación Agraria de “Cabra-Priego”, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Cabra, Spain; E-Mails: virginia.gonzalez.ext@juntadeandalucia.es (V.G.-C.); maria.i.lopez.infante@juntadeandalucia.es (M.-I.L.)

<sup>2</sup> Department of Animal Production, University of Cordoba, Campus Rabanales, 14071 Cordoba, Spain

<sup>3</sup> Department of Bromatology and Food Technology, University of Cordoba, Campus Rabanales, 14071 Cordoba, Spain

\* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: dcperez@uco.es (D.P.-M.); teresa.sanchez@uco.es (M.-T.S.); Tel.: +34-957-21-2576; Fax: +34-957-21-2000.

Received: 10 May 2011, in revised form: 30 May 2011 / Accepted: 31 May 2011 /

Published: 7 June 2011

---

**Abstract:** NIR spectroscopy was used as a non-destructive technique for the assessment of chemical changes in the main internal quality properties of wine grapes (*Vitis vinifera* L.) during on-vine ripening and at harvest. A total of 363 samples from 25 white and red grape varieties were used to construct quality-prediction models based on reference data and on NIR spectral data obtained using a commercially-available diode-array spectrophotometer (380–1,700 nm). The feasibility of testing bunches of intact grapes was investigated and compared with the more traditional must-based method. Two regression approaches (MPLS and LOCAL algorithms) were tested for the quantification of changes in soluble solid content (SSC), reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid and potassium content. Cross-validation results indicated that NIRS technology provided excellent precision for sugar-related parameters ( $r^2 = 0.94$  for SSC and reducing sugar content) and good precision for acidity-related parameters ( $r^2$  ranging between 0.73 and 0.87) for the bunch-analysis mode assayed using MPLS regression. At validation level, comparison of LOCAL and MPLS algorithms showed that the non-linear strategy

improved the predictive capacity of the models for all study parameters, with particularly good results for acidity-related parameters and potassium content.

**Keywords:** NIR spectroscopy; quality parameters; on-vine; bunch analysis

---

## 1. Introduction

The achievement of high quality standards in modern wine production depends on harvesting grapes at the optimum stage of ripeness [1]. By determining the right moment for harvesting, winemakers can ensure the best possible wine for any given year or conditions. For this purpose, it is essential to measure a number of grape quality parameters, including soluble solid content, reducing-sugar content, titratable acidity, pH-value, tartaric acid and malic acid contents and sensory attributes [2].

Flanzy [3] has noted that grape organic-acid content determines wine acidity, and also governs the stability, color and acceptability of the final product, since a wine with the right amount of acidity lingers longer on the palate. At the same time, accurate grape-quality measurements enable wineries to stream fruit for crushing and blending, thus maximizing the profitability of their production [4].

Existing analytical methods for the measurement of grape and wine composition do not meet the requirements of modern wine production in a global market, where there is a clear need for fast, accurate, simultaneous and non-destructive measurement of quality parameters both in the raw material and in the finished product [5-7].

Conventional laboratory techniques for measuring different quality characteristics in grapes and wines are tedious, time-consuming and technically demanding, and thus constitute a barrier to the widespread uptake and use of quality descriptors by the grape and wine industry [8].

Because certain variables change in the course of ripening, there is an evident need for non-invasive, objective methods of constantly monitoring the ripening process [9]. These methods can also be used to separate grapes of different qualities at harvest, thus increasing the economic value of the harvest as a whole through product differentiation [10].

The potential of NIRS technology as a non-destructive method for the quantitative characterization of grape quality parameters, using either grape berries or must, has been amply demonstrated [6,10-15]. However, all these studies have required a certain amount of data processing prior to analysis. The authors have thus failed to exploit one of the major advantages of NIRS: the fact that it requires no sample preparation, and is therefore very fast.

Although González-Caballero [7] have addressed the use of NIR spectroscopy models for predicting SSC, reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid levels and malic acid content in whole grapes using a spectral range of up to 1,700 nm, the authors stress that the results obtained when analyzing grapes in bunch form should only be considered a first step in the fine-tuning of NIRS technology for on-site control purposes, and that the expectations aroused by NIRS technology for quality control during the ripening process in intact grapes need to be confirmed by increasing the sample set, with a view to improving the specificity, accuracy and robustness of the calibrations obtained.

In practice, however, when new sample groups are included in the calibration set, robustness tends to be increased at the expense of accuracy [16]. One way of overcoming this problem is to develop specific calibrations for small groups of similar samples within the product domain [17]. The method used, known as local regression, combines the advantages of global calibrations obtained using a sample set large enough to ensure coverage of extensive product variation with the accuracy provided by specific calibrations [17].

Dambergers [12] reported improved accuracy in models to predict grape anthocyanin content and pH when sample subsets were selected on the basis of vintage, grape variety and growing region, due to a reduction of calibration non-linearity; in their view, the LOCAL algorithm appears to provide a practical solution to developing robust models for the prediction of these parameters in grapes. They note, however, that the models constructed using MPLS and LOCAL algorithms performed equally well for measuring total soluble solid content.

The aim of this study was to develop accurate and robust NIRS models for measuring major internal quality parameters in intact wine grapes (soluble solid content, reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid, and potassium content) during ripening and at harvest, regardless of growing season or variety, with a view to enabling growers to routinely use NIRS technology under field conditions to predict more precisely the timing of their harvest operations, and thus ensure the highest possible grape and wine quality.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Grape Sampling During Ripening

The sample set for all the parameters tested, except for potassium content, comprised 363 samples of 25 different white and red wine grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Grape bunches sourced from experimental vineyards at the Agricultural Research Training Centre at Cabra, near Cordoba (Spain), were harvested in July, August and September in 2006, 2007 and 2008. Grape samples were collected every seven days throughout the study. On arrival at the laboratory, grapes were promptly placed in refrigerated storage at 0 °C and 95% relative humidity. All samples were allowed to stabilize at room temperature (20 °C) prior to Vis–NIR spectral analysis.

### 2.2. Spectrum Collection

Spectra were collected using a Zeiss CORONA portable and non-contact diode-array spectrometer (model CORONA 45VIS/NIR, Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA) equipped with the turnstep module (revolving plate) and a 20-cm-diameter Petri dish to hold the samples, working in reflectance mode in the spectral range 380–1,700 nm, every 2 nm. The measurement distance from the source of light to the sample was 13 mm.

Samples were presented to the instrument in two modes. Spectra were first obtained for intact bunches of grapes. Berries were then passed through a hand-operated food mincer (LI 240, Sammic, SL, Azpeitia, Guipúzcoa, Spain) which enabled constant pressure to be maintained during juice extraction with minimal seed and skin shearing. The must was then centrifuged at 4,000 rpm for 10 min (Centronic 7000577, Selecta, Barcelona, Spain) to remove suspended solids, and the



supernatant was used for NIR spectroscopy purposes. A folded-transmission gold reflector cup, diameter 3.75 cm, was used with a pathlength of 0.1 mm.

Eight spectra were captured per sample for each sample presentation mode, and the average of the eight was used in calculations. The signal was captured using CORA software version 3.2.2 (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA), and subsequently pretreated using the Unscrambler version 9.1 program (CAMO, ASA, Oslo, Norway).

### 2.3. Reference Data Analysis

For each sample, reference data were obtained for SSC, reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid and potassium content. SSC (°Brix), reducing sugar content, must pH-value, titratable acidity, and tartaric and malic acid contents were measured as indicated by González-Caballero [7]. Potassium content was measured using a CORNING 410 flame photometer (Ciba Corning Diagnostics Limited, Halstead, UK) as previously described by the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food [18]. Results were expressed as milligrams per liter.

### 2.4. Calibration and Validation Sets

The sample set, except for potassium cation, comprised all the available samples (363 samples; 25 varieties) picked during ripening: 108 samples collected in 2006, 120 samples in 2007, and 135 samples in 2008. After eliminating as outliers ( $n = 2$  samples for 2006;  $n = 4$  samples for 2007;  $n = 13$  samples for 2008) those grapes considered over-ripe and thus displaying high sugar content, the initial sample set was divided in two subsets: 251 samples (73% of the total) were used to construct calibration models (calibration set), and the remaining 93 samples (27%), all picked in 2008, were used for external validation (validation set). It should be stressed that the calibration set contained all available samples from 2006 (106 samples) and 2007 (116 samples), together with 29 samples from 2008. These sets were used to develop and subsequently validate models to predict SSC, reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, and malic acid. The calibration and validation sets used to predict potassium content contained only samples from 2008: 104 (80%) for calibration and 44 (20%) for external validation. In all cases, samples were selected solely on the basis of spectral data, following Shenk and Westerhaus [19], using the CENTER algorithm included in the WinISI II software package version 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA) prior to developing NIRS calibrations, in order to determine the structure and spectral variability of the study population. This algorithm was applied over the samples belonged to 2008 season.

### 2.5. Chemometric Data Treatment

The WinISI II software package version 1.50 was used for the chemometric treatment of data [20]. Prior to model development using the two regression algorithms (MPLS and LOCAL), different pre-processing combinations were evaluated. As spectral treatments, standard normal variate plus detrending [21] were used to remove multiplicative scatter interferences, and four derivative treatments were tested (1,5,5,1; 2,5,5,1; 1,10,5,1 and 2,10,5,1), where the first number denotes the derivative order, the second denotes the number of nanometers in the segment used to calculate the derivative,

and the third and fourth numbers denote the number of data points over which running-average smoothing was conducted [20,22].

First, quantitative calibrations were developed using the MPLS algorithm [23] for predicting internal quality parameters using the bunch as presentation sample; the results were then compared with the calibrations obtained for must. For cross-validation, the calibration set was partitioned into 4 groups; each group was then validated using a calibration developed on the other samples in order to select the optimal number of factors and to avoid overfitting.

The LOCAL algorithm [17] was then used to predict the same quality parameters but using only the bunch as sample presentation, since this is how the winery industry receives the raw material. The LOCAL algorithm operates by searching and selecting from a library (based on the training set) the samples most spectrally similar to the sample to be predicted. The selected samples are used to develop a specific (local) calibration using a modified PLS regression for the prediction of the unknown sample. Selection is based on the coefficient of correlation between the spectrum of the sample to be predicted and each of the sample spectra belonging to the spectral library; those samples displaying the highest correlation are selected.

Different parameters have to be evaluated in order to optimize the LOCAL algorithm [24,25]. In the present study, for each dataset, an optimization design was set up by varying the number of calibration samples ( $k$ ) from 25 to 150 in steps of 25, but including 110, for predicting SSC, reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid; and from 25 to 75 in steps of 25 for predicting potassium content in bunches; the number of PLS terms ( $l$ ) was varied from 14 to 16 in steps of 1, where the number of predicted values corresponding to the first PLS terms discarded was 4. Finally, the minimum number of samples used for each calibration was set to 15.

For both algorithms, the following spectral regions were tested for calibration purposes: 380–1,650 nm (the highest spectral range with useful information covering the VIS + NIR regions); 780–1,650 nm (the highest spectral range covering the NIR region and including the very near infrared region) and 1,100–1,650 nm (including only the strict near-infrared region). In order to eliminate noise at the end of the spectral range, the region between 1,650–1,700 nm was discarded.

Mahalanobis distance statistics,  $H_{\text{global}}$  and  $H_{\text{neighbour}}$ , were computed from the principal components of the selected samples to check the accuracy of predictions [17,26]. The effect of the different settings on the performance of MPLS and LOCAL was evaluated by comparing the standard error of prediction (SEP), the coefficient of regression for the external validation ( $r^2$ ), the bias, and the standard error of prediction corrected for bias or SEP(c).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Chemical Composition

During ripening, the study parameters covered a relatively wide range, due to the constant changing of sample matrices. Changes in chemical composition are shown in Table 1, which also indicates the number of samples in the calibration and validation sets following application of the CENTER algorithm, together with mean, standard deviation (SD), and coefficient of variation (CV) values. Samples were collected over the critical months to check for variations in SSC (10.60–58.60 °Brix),

titratable acidity (0.20–20.50 g/L tartaric acid) and tartaric acid (4.90–18.60 g/L tartaric acid) in the berry.

**Table 1.** Statistical analysis of calibration and validation sets: data range, mean and standard deviation (SD) and coefficient of variation (CV).

Parameter	Item	Calibration Set	Validation Set
		(n = 251 Except Potassium, n = 104)	(n = 93, Except Potassium, n = 44)
Soluble solid content (°Brix)	Range	10.60–58.60	11.80–27.50
	Mean	20.49	19.88
	SD	5.84	3.77
	CV (%)	28.51	18.96
Reducing sugar content (g/L)	Range	81.50–586.40	114.30–287.00
	Mean	198.39	203.88
	SD	64.95	41.58
	CV (%)	32.74	20.40
pH-value	Range	2.48–4.60	2.60–3.80
	Mean	3.35	3.33
	SD	0.34	0.25
	CV (%)	10.19	7.60
Titratable acidity (g/L tartaric acid)	Range	0.20–20.50	3.40–19.10
	Mean	6.72	6.42
	SD	3.52	3.07
	CV (%)	52.29	47.79
Tartaric acid (g/L tartaric acid)	Range	4.90–18.60	7.30–15.70
	Mean	9.48	9.74
	SD	2.80	1.96
	CV (%)	29.53	20.14
Malic acid (g/L malic acid)	Range	0.10–14.50	0.30–13.10
	Mean	2.33	2.74
	SD	2.32	2.51
	CV (%)	99.71	91.85
K (mg/L)	Range	841.00–2,737.00	938.00–2,522.00
	Mean	1,692.28	1,675.99
	SD	401.12	340.02
	CV (%)	23.70	20.29

The sample set was highly variable, since it contained data from grapes sampled at different stages of ripening over three years; this accounts to a large extent for the high CV values recorded, particularly for SSC, reducing sugar content, titratable acidity, tartaric acid, malic acid and potassium content (Table 1). The results confirm the suitability of this method for selecting the validation set, since calibration and validation set displayed similar values for mean, SD, range and CV for all parameters studied, and the ranges for the validation set lay within the range recorded for the calibration set.

During veraison and until ripening, there is a progressive decline in malic, and to a lesser extent in tartaric acid levels. Flanzy [3] notes that tartaric acid is mostly formed in growing organs and cannot be metabolized except at temperatures over 35 °C. Since temperatures are highest at the end of ripening, it is at this stage when the lowest tartaric acid levels are recorded. Malic acid is synthesized following the combustion of sugars in chlorophyll-containing tissues. Unlike tartaric acid, it is unstable, and is metabolized during ripening, leading to low levels at harvest.

Potassium is the major mineral cation in grapes and plays a major role in the neutralization of tartaric and malic acid in the berries, thereby affecting the grape's acid profile [27,28]. Potassium directly determines the pH not only of wine but also of must [29]. It is present in wines mainly as potassium bitartrate, an unstable compound that can precipitate at cool temperatures as a crystalline deposit [30].

### 3.2. Calibration Development using MPLS Regression and NIR Spectra

#### 3.2.1. Prediction of Sugar-Related Quality Parameters in Grapes

Table 2 shows the best calibration models obtained using the global set ( $n = 251$ ) for the prediction of SSC and reducing sugar content according to the spectral range and derivative treatment used, for bunches and musts, using the MPLS algorithm.

The equation displaying the greatest predictive capacity for SSC in bunches was that obtained over the broadest spectral range, *i.e.*, 380–1,650 nm, with statistical values of  $r^2 = 0.94$ ;  $SECV = 1.00$  °Brix;  $RPD = 4.12$ ;  $CV = 5.08\%$ . The predictive capacity of this equation was slightly poorer than that of the equation obtained with grape must ( $RPD = 4.29$ ;  $CV = 4.81\%$ ). However, both models displayed excellent predictive capacity in term of the criteria outlined by Williams [31], who suggest that an  $r^2$  value greater than 0.9 and RPD values greater than 3 indicate excellent quantitative information.

For reducing sugar content, the equation displaying the greatest predictive capacity in bunches was obtained over the range 780–1,650 nm, yielding statistical values for  $r^2$ ,  $SECV$  and  $RPD$  slightly higher than those obtained for must samples. The  $RPD$  value (3.95) together with the  $r^2$  value (0.94) for bunches demonstrated the robustness and power of the calibration models.

No previously-published studies address the direct measurement of SSC in bunches, and values reported for measurements in berries tend to be lower than those obtained here; Larraín [13], for example, recorded an  $RPD$  value of 3.40. Kemps [10] reported a  $RPD$  value of 5.05 when measuring sugar concentrations in grape berries.

The literature contains only one report evaluating the use of NIRS to measure internal sugar-related quality parameters in grape bunches [7]. The results obtained for SSC ( $r^2 = 0.89$ ;  $SECV = 1.41$  °Brix;  $RPD = 2.92$ ) and reducing sugar content ( $r^2 = 0.87$ ;  $SECV = 17.13$  g/L;  $RPD = 2.77$ ) were lower than those recorded here, confirming the need to work with broad-based sample sets which reflect existing variability, with a view to increasing model robustness and precision. Williams [31] and Pérez-Marín [32] highlight the importance of both sample set size and sample distribution within the calibration set, noting that sample sets for calibration should ideally ensure uniform distribution of composition across the range of the study parameter in question.

**Table 2.** Calibration statistics for the models obtained for predicting soluble solid content (SSC), reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid and potassium content for the different sample presentations and spectral ranges studied (calibration set,  $n = 251$  samples except for potassium cation,  $n = 104$ ) using MPLS regression.

Parameter	Sample Presentation	Spectral Range (nm)	Mathematic Treatment	Mean <sup>1</sup>	SD <sup>2</sup>	SEC <sup>3</sup>	R <sup>2,4</sup>	SECV <sup>5</sup>	r <sup>2,6</sup>	RPD <sup>7</sup>	CV(%) <sup>8</sup>
SSC (°Brix)	Bunch	380–1,650	2,5,5,1	19.71	4.13	0.74	0.97	1.00	0.94	4.12	5.08
	Must	780–1,650	1,10,5,1	19.92	4.11	0.86	0.96	0.96	0.95	4.29	4.81*
Reducing sugar content (g/L)	Bunch	780–1,650	2,5,5,1	191.72	53.80	10.76	0.96	13.63	0.94	3.95	7.11*
	Must	380–1,650	2,5,5,1	195.48	51.14	12.00	0.94	15.36	0.91	3.33	7.86
pH-value	Bunch	380–1,650	1,10,5,1	3.34	0.33	0.10	0.91	0.12	0.87	2.73	3.60*
	Must	380–1,650	1,5,5,1	3.36	0.34	0.20	0.65	0.21	0.60	1.58	6.39
Titratable acidity (g/L tartaric acid)	Bunch	380–1,650	1,10,5,1	6.11	2.57	0.96	0.86	1.07	0.83	2.40	17.49*
	Must	380–1,650	1,5,5,1	5.94	2.48	0.82	0.89	1.11	0.80	2.24	18.62
Tartaric acid (g/L tartaric acid)	Bunch	380–1,650	1,10,5,1	9.20	2.49	1.08	0.81	1.18	0.78	2.11	12.78*
	Must	380–1,650	1,5,5,1	8.90	2.36	1.21	0.74	1.28	0.71	1.85	14.35
Malic acid (g/L malic acid)	Bunch	380–1,650	2,5,5,1	1.86	1.57	0.68	0.82	0.81	0.73	1.94	43.48
	Must	380–1,650	2,10,5,1	1.85	1.57	0.56	0.87	0.74	0.78	2.13	39.69*
K (mg/L)	Bunch	380–1,650	1,5,5,1	1,634.35	324.74	193.06	0.65	242.26	0.44	1.34	14.82*
	Must	380–1,650	1,5,5,1	1,676.75	319.49	242.97	0.42	258.94	0.35	1.23	15.44

<sup>1</sup> mean of the calibration set; <sup>2</sup> standard deviation; <sup>3</sup> standard error of calibration; <sup>4</sup> coefficient of determination of calibration; <sup>5</sup> standard error of cross validation; <sup>6</sup> r<sup>2</sup>: coefficient of determination of cross validation; <sup>7</sup> ratio SD/SECV; <sup>8</sup> coefficient of variation; \* best equation.

### 3.2.2. Prediction of Acidity-Related Quality Parameters in Grapes

For pH-value, the best statistics ( $r^2 = 0.87$ ; SECV = 0.12; RPD = 2.73) for bunch analysis were obtained with the first derivative treatment in the spectral range 380–1,650 nm (Table 2). The value obtained for  $r^2$  (0.87) would, according to the guidelines put forward by Williams [31], provide sufficiently good quantitative information to enable the classification of musts obtained from these grapes, thus allowing musts to be adjusted prior to fermentation. Interestingly, bunch analysis yielded better results than must presentation for pH-value: RPD = 2.73 and CV = 3.60% for bunch mode and RPD = 1.58 and CV = 6.39% for must presentation.

The results obtained using bunch analysis were better than those obtained by González-Caballero [7] ( $r^2 = 0.69$ ; SECV = 0.19; RPD = 1.81), by Cozzolino [33] (RPD = 1.4) and by Larraín [13] (RPD = 2.2); in both these studies, samples were presented in berry form.

Models constructed to predict other acidity-related parameters in bunches (Table 2) may be considered good, as indicated by the values obtained for the determination coefficient ( $r^2 = 0.83$  for titratable acidity;  $r^2 = 0.78$  for tartaric acid; and  $r^2 = 0.73$  for malic acid) [31]. It should also be stressed

that the best equations for titratable acidity ( $r^2 = 0.83$ ; SECV = 1.07 g/L; RPD = 2.40) and tartaric acid content ( $r^2 = 0.78$ ; SECV = 1.18 g/L; RPD = 2.11) were obtained using bunch rather than must analysis. Although better results were obtained for malic acid content using must analysis ( $r^2 = 0.78$ ; SECV = 0.74 g/L; RPD = 2.13), the statistics obtained for bunch analysis indicated a fairly similar predictive capacity ( $r^2 = 0.73$ ; SECV = 0.81 g/L; RPD = 1.94).

As was the case with sugar-related parameters, and due to an increase in the number and variability of the samples in the calibration set, the models constructed here displayed greater predictive capacity than those obtained by González-Caballero [7] who, in a study of bunch presentation using a set of 108 samples, reported the following values: titratable acidity RPD = 1.35, CV = 24.63%; tartaric acid content RPD = 1.38, CV = 16.02%; and malic acid content RPD = 1.28, CV = 88.42%.

### 3.2.3. Prediction of Potassium Content in Grapes

The predictive capacity of the models constructed to predict potassium content both in bunches and in must was relatively poor. For bunch analysis, statistical values ( $r^2 = 0.44$ ; SECV = 242.26 mg/L) indicated that models were sufficient to distinguish between samples containing high and low levels of potassium [31]. It should be noted that the calibration set available comprised only samples picked in 2008; it is therefore reasonable to assume that—as was the case with sugar-related and acidity-related parameters—the predictive ability of the models could be improved by increasing the number of samples and the variability of sample sets by using samples picked in successive years.

Potassium is the major mineral cation in grapes. Potassium levels thus influence the grape's acid profile and thus the final quality of the wine obtained. Simultaneous measurement of potassium levels along with other internal quality parameters is therefore clearly of interest to the wine industry.

There are no previous reports on the use of NIR spectroscopy to measure potassium content in grapes, even though information on crop nutrition is essential for winegrowers, enabling them to adequately establish nutrient requirements and to fine-tune fertilizer rates. Sauvage [34], however, have measured potassium levels in wine using this method ( $r^2 = 0.86$ ; SECV = 79.00 mg/L).

### 3.3. Comparison of Grape Internal Quality Parameters using MPLS versus LOCAL Algorithms

The LOCAL algorithm was also used to predict internal quality parameters in bunches. The best SEPc values obtained with the best mathematical treatments and spectral ranges over 21 runs (7 values for  $k$  and 3 for  $l$ ) are shown in Figure 1. The lowest values for SEPc were achieved with the lowest values for  $k$ . For application of the LOCAL strategy, only 25 samples were used to predict malic acid and potassium content; 50 samples were used for SSC and reducing sugar content predictions, and 75 samples were used for pH, titratable acidity and tartaric acid. Samples were selected as being the most representative of the calibration set, rather than using all the 251 samples or the 104 samples in the case of potassium cation employed to construct the calibration model using MPLS regression.

**Figure 1.** Best SEP<sub>c</sub> values for the prediction of quality parameters in intact grapes using the LOCAL algorithm for the different selected samples values (*k*), PLS factors (*l*), the best mathematic treatments developed and spectral ranges. (◆) 14 PLS factors; (■) 15 PLS factors, (▲) 16 PLS factors).

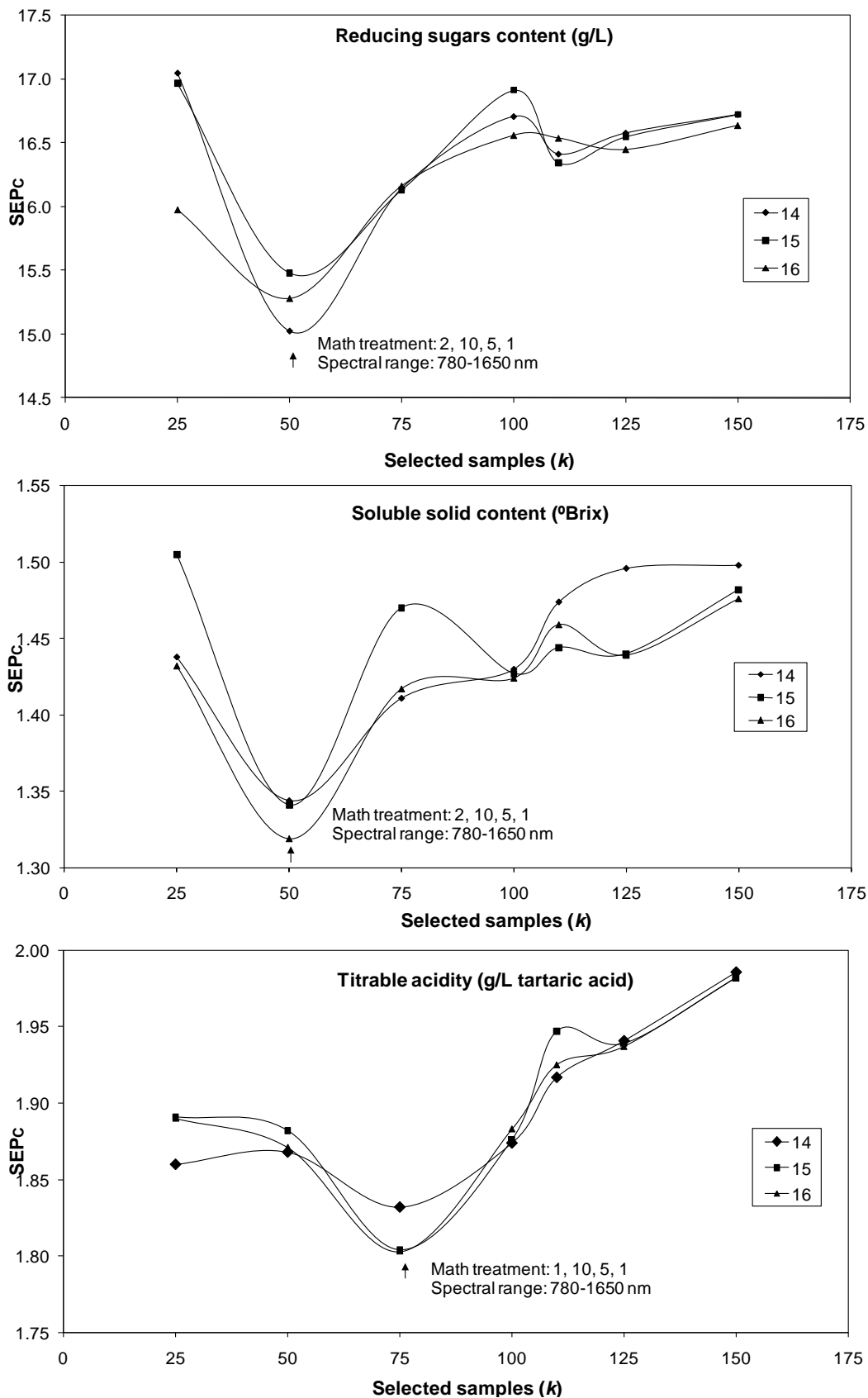


Figure 1. Cont.

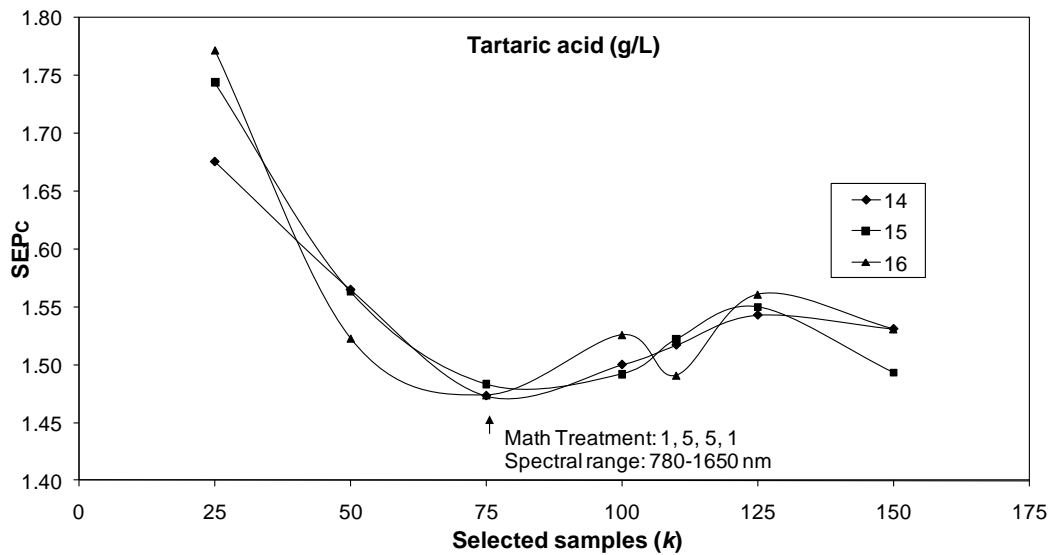
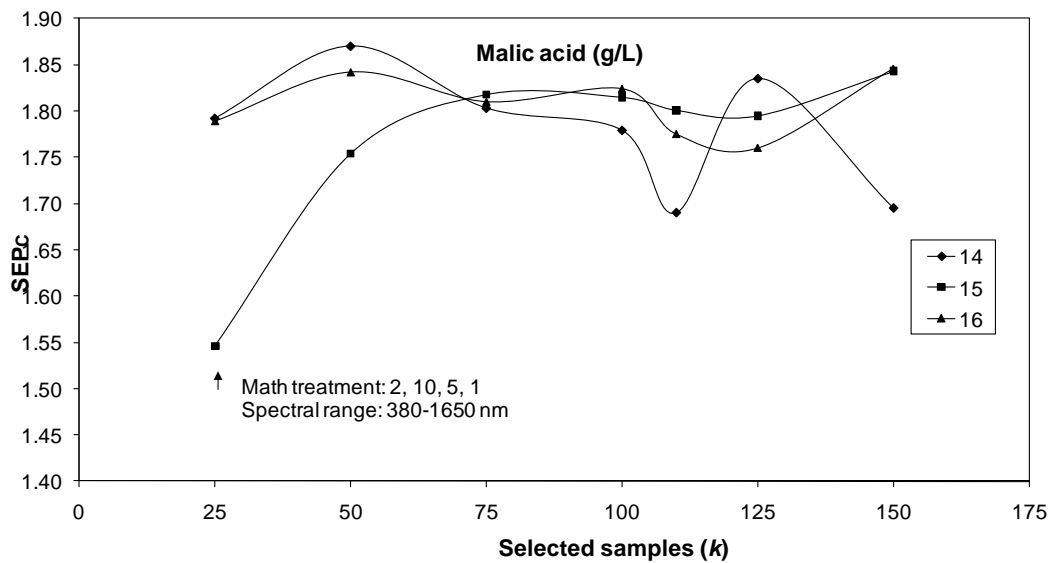
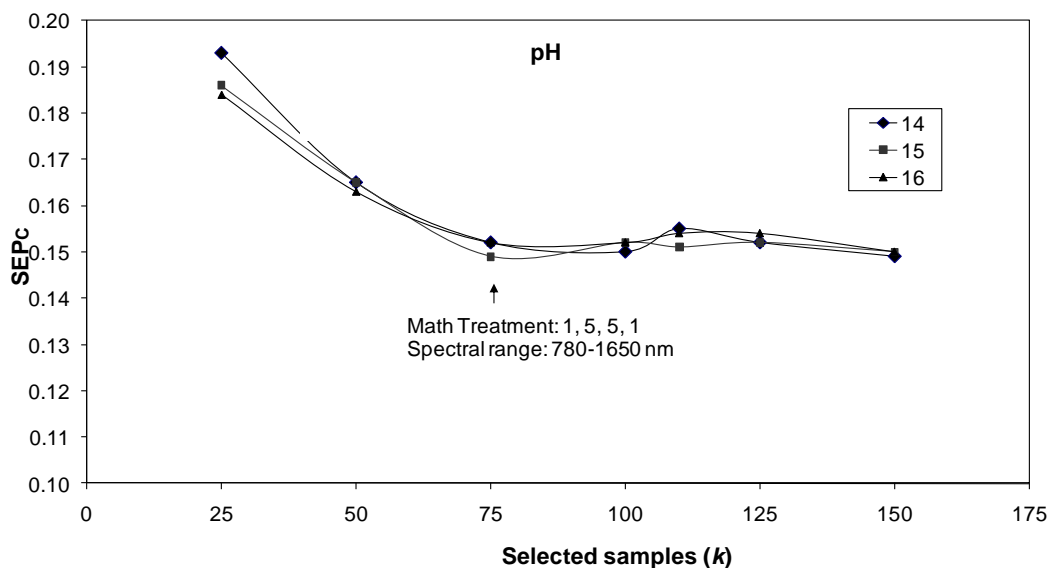
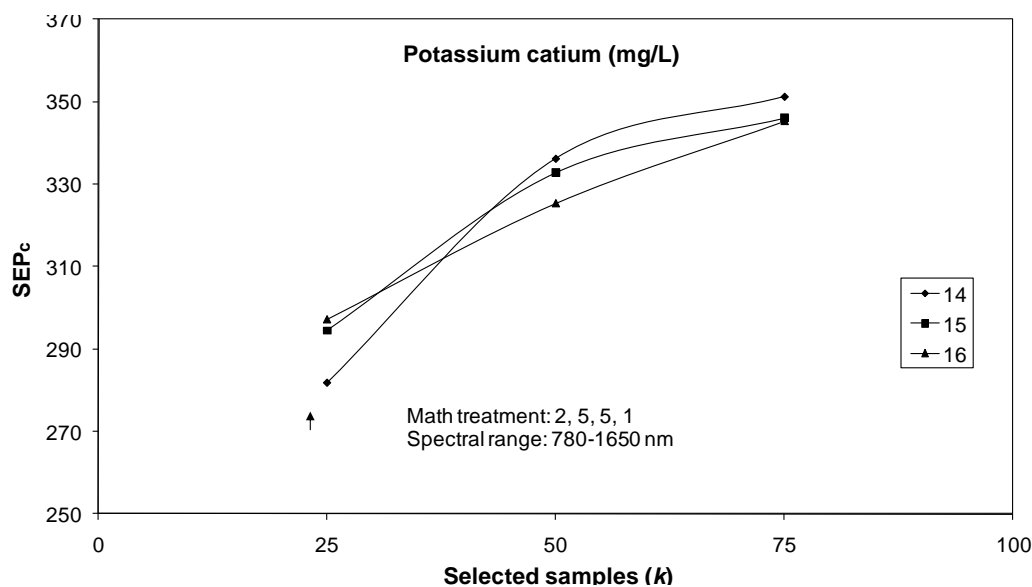




Figure 1. Cont.



In most cases, the values selected for parameter  $l$  (number of PLS terms) had little influence on SEPC values; marked differences being observed only for SSC and malic acid. The best results achieved with the LOCAL algorithm were then compared with those obtained using MPLS regression for the prediction of the 93-sample validation set except for the potassium cation ( $n = 44$ ), using only bunch analysis (Table 3).

It needs to point out that the systematic procedure follows in this work is more favourable for the LOCAL algorithm, since the tuning of LOCAL was done on the validation set, with 21 combinations of parameters, being selected the one with best SEP, while the best MPLS model was chosen taking into account the cross validation statistics and only the best model applied to the validation set. Nevertheless, this systematic has been selected since the differences between the statistics obtained for the MPLS models were no-relevant, and also taking into account that cross-validation statistics, according to Shenk [23], give a realistic estimate of the error prediction of samples not included in the calibration.

The results obtained using LOCAL were better than those achieved using MPLS regression, in terms of both  $r^2$  and SEPC, for total soluble solid content, reducing sugar content, pH, tartaric acid and potassium content, although the improvement was only slight for reducing sugar and tartaric acid content. For titratable acid and malic acid, application of the LOCAL algorithm improved model precision but also prompted a slight increase in SEPC values.

The improvement in  $r^2$  values achieved using the non-linear strategy ranged between 2% for both tartaric acid and reducing sugar content and 41% for malic acid, while the improvement in SEPC values ranged from 1.5% for tartaric acid to 22% for SSC. Shenk [35] suggest that application of the LOCAL algorithm can improve the predictive capacity of models by 10–30%.

With regard to spectral range suitability, the best results using the LOCAL strategy were generally obtained in the 780–1,650 nm range, except for malic acid content; by contrast, MPLS yielded the best results for all parameters using a wider spectral range (380–1,650 nm), except for reducing sugar content. The optimal number of PLS terms for the prediction of each parameter using the LOCAL algorithm (Table 3) was always equal to or smaller than the optimal number using MPLS.

**Table 3.** Validation statistics for the best models for predicting soluble solid content (SSC), reducing sugar content, pH-value, titratable acidity, tartaric acid, malic acid and potassium content using MPLS and LOCAL algorithms.

Parameter	Method	Mathematic Treatment	Spectral Region	Factors	SEP <sup>1</sup>	SEPC <sup>2</sup>	Bias	r <sup>2</sup> <sup>3</sup>	Slope
SSC (°Brix)	MPLS	2,5,5,1	380–1,650	16	1.69	1.69	0.17	0.80	0.97
	LOCAL ( <i>k</i> = 50)	2,10,5,1	780–1,650	16 (−4)	1.33	1.32	0.24	0.88	0.96
Reducing sugar content (g/L)	MPLS	2,5,5,1	780–1,650	16	16.67	15.80	5.57	0.86	0.94
	LOCAL ( <i>k</i> = 50)	2,10,5,1	780–1,650	14 (−4)	16.40	15.02	6.77	0.88	0.91
pH-value	MPLS	1,10,5,1	380–1,650	16	0.17	0.17	0.02	0.58	0.84
	LOCAL ( <i>k</i> = 75)	1,5,5,1	780–1,650	15 (−4)	0.15	0.15	0.02	0.66	1.11
Titratable acidity (g/L tartaric acid)	MPLS	1,10,5,1	380–1,650	16	1.73	1.67	−0.49	0.48	0.85
	LOCAL ( <i>k</i> = 75)	1,10,5,1	780–1,650	16 (−4)	1.87	1.80	−0.54	0.66	0.97
Tartaric acid (g/L tartaric acid)	MPLS	1,10,5,1	380–1,650	16	1.60	1.49	0.60	0.46	0.88
	LOCAL ( <i>k</i> = 75)	1,5,5,1	780–1,650	14 (−4)	1.47	1.47	0.08	0.47	0.79
Malic acid (g/L malic acid)	MPLS	2,5,5,1	380–1,650	16	1.39	1.39	0.20	0.30	0.95
	LOCAL ( <i>k</i> = 25)	2,10,5,1	380–1,650	15 (−4)	1.54	1.55	−0.02	0.51	0.89
K (mg/L)	MPLS	1,5,5,1	380–1,650	14	300.23	301.15	−38.83	0.29	0.67
	LOCAL ( <i>k</i> = 25)	2,5,5,1	780–1,650	14 (−4)	284.52	281.71	−69.02	0.39	0.80

<sup>1</sup> standard error of prediction; <sup>2</sup> standard error of prediction bias-corrected; <sup>3</sup> coefficient of determination of prediction.

#### 4. Conclusions

The results obtained here when analyzing grapes in bunch form—a method that requires no previous sample preparation—confirm that NIRS technology is well suited for evaluating internal quality characteristics related to sugar content and acidity, for the non-destructive quantification of chemical changes taking place during on-vine ripening, and for deciding on the optimum time for harvesting. NIR technology additionally enables the classification of bunches in terms of low *versus* and high potassium levels, using a very fast, non-destructive sensor.

The results also highlight the need to develop models using a database sufficiently large to reflect the spectral variability that may be encountered during on-vine ripening. In comparison with MPLS regression, the LOCAL algorithm proved to be a highly effective tool for improving the prediction of internal quality parameters in intact grapes.

#### Acknowledgements

This research was funded by the Andalusian Regional Government under the Research Excellence Program (Project No. P09-AGR-5129 “MEMS and NIRS-image sensors for the *in situ* non-destructive analysis of food and feed”).

## References

1. Menesatti, P. In-Field Spectrophotometric Measurement to Estimate Maturity Stage of Wine Grapes. *Proc. SPIE* **2007**, *6761*, 676118.
2. Moreno, J.; Peinado, R.A. *Química Enológica*; A. Madrid Vicente and Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 2010.
3. Flanzy, C. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*; Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 2003.
4. Sas, A. *The Missing Gap: Measuring and Paying for Grape Quality*; Blair, R., Williams, P., Pretorius, S., Eds.; The Australian Wine Research Institute: Adelaide, Australia, 2008; pp. 52-55.
5. Fernández-Navales, J.; López, M.I.; Sánchez, M.T.; Morales, J.; González-Caballero, V. Shortwave-Near Infrared Spectroscopy for Determination of Reducing Sugar Content during Grape Ripening, Winemaking and Aging of White and Red Wines. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 285-291.
6. Fernández-Navales, J.; López, M.I.; Sánchez, M.T.; García-Mesa, J.A.; González-Caballero, V. Assessment of Quality Parameters in Grapes during Ripening Using a Miniature Fiber-Optic Near-Infrared Spectrometer. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2009**, *60*, 265-277.
7. González-Caballero, V.; Sánchez, M.T.; López, M.I.; 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.* **2010**, doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.06.016.
8. Gishen, M.; Damberg, R.G.; Kambouris, A.; Kwiatkowski, M.; Cynkar, W.U.; Høj, P.B. Application of Near Infrared Spectroscopy for Quality Assessment of Grapes, Wine and Spirits. In *Proceedings of 9th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*, Verona, Italy, 13–18 June 1999; pp. 917-920.
9. Herrera, J.; Guesalaga, A.; Agosin, E. Shortwave-Near Infrared Spectroscopy for Non-Destructive Determination of Maturity of Wine Grapes. *Meas. Sci. Tech.* **2003**, *14*, 689-697.
10. Kemps, B.; León, L.; Best, S.; De Baerdemaeker, J.; De Ketelaere, B. Assessment of the Quality Parameters in Grapes using VIS/NIR Spectroscopy. *Biosyst. Eng.* **2010**, *105*, 507-513.
11. Cozzolino, D.; Damberg, R.G.; Janik, L.; Cynkar, W.U.; Gishen, M. Analysis of Grapes and Wine by Near Infrared Spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2006**, *14*, 279-289.
12. Damberg, R.G.; Cozzolino, D.; Cynkar, W.U.; Janik, L.; Gishen, M. The Determination of Red Grape Quality Parameters using the LOCAL Algorithm. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2006**, *14*, 71-79.
13. Larraín, M.; Guesalaga, A.R.; Agosin, E. A Multipurpose Portable Instrument for Determining Ripeness in Wine Grapes using NIR Spectroscopy. *IEEE T. Instrument. Meas.* **2008**, *57*, 294-302.
14. Cao, F.; Wu, D.; He, Y. Soluble Solids Content and pH Prediction and Varieties Discrimination of Grapes Based on Visible–Near Infrared Spectroscopy. *Comput. Electron. Agr.* **2010**, *71*, S15-S18.
15. Guidetti, R.; Beghi, R.; Bodria, L. Evaluation of Grape Quality Parameters by a Simple Vis/NIR System. *T. ASABE.* **2010**, *53*, 477-484.
16. Berzaghi, P.; Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. LOCAL Prediction with Near Infrared Multi-Product Databases. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2000**, *8*, 1-9.

17. Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O.; Berzaghi, P. Investigation of a LOCAL Calibration Procedure for Near Infrared Instruments. *J. Near Infrared Spectrosc.* **1997**, *5*, 223-232.
18. Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Official Methods of Analysis. Vol. II*; Secretaría General de Alimentación, Dirección General de Política Alimentaria: Madrid, Spain, 1993; pp. 35-319.
19. Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. Population Definition Sample Selection and Calibration Procedures for Near Infrared Spectra and Modified Partial Least Squares Regression. *Crop Sci.* **1991**, *31*, 469-474.
20. ISI. *The Complete Software Solution Using a Single Screen for Routine Analysis, Robust Calibrations, and Networking*; Manual, FOSS NIRSystems/TECATOR; Infrasoft International: Silver Spring, MD, USA, 2000.
21. 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.
22. Shenk, J.S.; Westerhaus M.O. Calibration the ISI Way. In *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*; Davies, A.M.C., Williams, P.C., Eds.; NIR Publications: Chichester, UK, 1996; pp. 198-202.
23. Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O. *Analysis of Agricultural and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*; NIRSystems, Inc.: Silver Spring, MD, USA, 1995.
24. Dardenne, P.; Sinnaeve, G.; Baeten, V. Multivariate Calibration and Chemometrics for Near Infrared Spectroscopy: Which Method? *J. Near Infrared Spectrosc.* **2000**, *8*, 229-237.
25. Pérez-Marín, D.; Garrido-Varo, A.; Guerrero, J.E. Non-Linear Methods in NIRS Quantitative Analysis. *Talanta* **2007**, *72*, 28-42.
26. Barton II, F.E.; Shenk, J.S.; Westerhaus, M.O.; Funk, D.B. The Development of Near Infrared Wheat Quality Models by Locally Weighted Regressions. *J. Near Infrared Spectrosc.* **2000**, *8*, 201-208.
27. Hidalgo, L. *Tratado de Viticultura General*; Mundi-Prensa Libros, S.A.: Madrid, Spain, 2004.
28. Da Mota, R.V.; De Souza, C.R.; Favero, A.C.; Silva, C.P. C.E.; Do Carmo, E.L.; Fonseca, A.R.; Regina, M.D. Productivity and Physicochemical Composition of Berries of Grapevine Cultivars Grafted onto Different Rootstocks. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **2009**, *44*, 576-582.
29. González, L.A.; Armas, P.A.; González, J.E.; García, M.J.; Vidarte, E.; Pomar, M. Estudio de los cationes sodio, potasio, hierro y cobre, durante la maduración de las cepas Listán negro, Listán blanco y Nnegramoll. D.O.Tacoronte-Acentejo. *Jornadas Técnicas Vitivinícolas Canarias* **1997**, *1997*, 21-26.
30. Rankine, B. *Making Good Wine. A Manual of Winemaking Practice for Australia and New Zealand*; Pan Macmillan: London, UK, 2004.
31. Williams, P.C. Implementation of Near-Infrared Technology. In *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*; Williams, P.C., Norris, K.H., Eds.; AACC, Inc.: St. Paul, MN, USA, 2001; pp. 145-169.
32. Pérez-Marín, D.; Garrido-Varo, A.; Guerrero, J.E. Implementation of LOCAL Algorithm with Near-Infrared Spectroscopy for Compliance Assurance in Compound Feedstuffs. *Appl. Spectrosc.* **2005**, *59*, 69-77.

33. Cozzolino, D.; Esler, M.B.; Damberg, R.G.; Cynkar, W.U.; Boehm, D.R.; Francis, I.L.; Gishen, M. Prediction of Color and pH in Grapes using a Diode Array Spectrophotometer (400–1,100 nm). *J. Near Infrared Spectrosc.* **2004**, *12*, 105-111.
34. Sauvage, L.; Frank, D.; Stearne, J.; Millikan, M.B. Trace Metal Studies of Selected White Wines: An Alternative Approach. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 223-230.
35. Shenk, J.S.; Workman, J.J., Jr.; Westerhaus, M.O. Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. In *Handbook of Near Infrared Analysis, Second Edition*; Practical Spectroscopy Series; Burns, D.A., Ciureczak, E.W., Eds.; Marcel Dekker: Monticello, NY, USA, 2001; Volume 27, pp. 419-473.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

**4.3. ON-VINE MONITORING OF GRAPE RIPENING USING NEAR  
INFRARED SPECTROSCOPY. FOOD ANALYTICAL METHODS (2012)**



# On-Vine Monitoring of Grape Ripening Using Near-Infrared Spectroscopy

Virginia González-Caballero · María-Teresa Sánchez ·  
Juan Fernández-Novales · María-Isabel López ·  
Dolores Pérez-Marín

Received: 9 December 2011 / Accepted: 23 February 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

**Abstract** This study evaluated the ability of near-infrared (NIR) spectroscopy to characterise the behaviour of white and red grapes during on-vine ripening, as a function of grape position in the bunch (high, middle and low) and bunch orientation (north, south, east and west) and to distinguish between different ripening stages with a view to optimising harvesting times depending on the grape variety and the type of wine to be made. A total of 24 bunches of two wine-grape varieties (cv. Pedro Ximénez and cv. Cabernet Sauvignon) were labelled and analysed directly on the vine using a commercially available handheld micro-electro-mechanical system spectrophotometer (1,600–2,400 nm). Principal component analysis was performed to study relationships between the various configurations (grape position and bunch orientation), ripening stages and spectral data. Results for the white-grape variety showed that grapes high on the bunch behaved differently during ripening from those in central or low positions and that east-facing bunches behaved differently from the rest. For both varieties, analysis of bunch spectral characteristics

enabled three stages of ripening to be distinguished: early, middle and late. Subsequently, the ability of NIR technology to classify wine grapes as a function of reducing-sugar content, with a view to optimising harvest timing, was evaluated by partial least squares discriminant analysis: 88% of white grapes and 88% of red grapes were correctly classified while over 79% of samples were correctly assigned to representative groups. These results confirmed that NIR technology in the spectral range 1,600–2,400 nm is an appropriate technique for on-vine monitoring of the ripening process, enabling selective harvesting depending on the type of wine to be made.

**Keywords** NIR spectroscopy · Wine grape · On-vine · Ripening · Portable sensor

## Introduction

The monitoring of bunch development and of within-bunch variations in grape composition during on-vine ripening is an essential part of ensuring high-quality wines; winemakers nearly always identify uniform batches of good-quality fruit as their main priority (Bramley 2005).

Since grape heterogeneity may influence final wine composition and quality, it should be carefully evaluated at harvest (Kontoudakis et al. 2011). At any given date, the physiological characteristics of grape berries in a vineyard may vary considerably (Torchio et al. 2010).

It is equally important for winemakers to be aware of the factors influencing harvest timing, many of which are beyond their control. Among the major factors are weather conditions: seasonal variations including heat waves and sudden heavy rains can be extremely detrimental to plant health and may lead to over-ripening, thus impairing final wine quality (Ruiz-Hernández 2001).

---

V. González-Caballero · M.-I. López  
Centro de Investigación y Formación Agraria de “Cabra-Priego”,  
Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera  
(IFAPA), Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía,  
Cabra, Córdoba, Spain

M.-T. Sánchez (✉) · J. Fernández-Novales  
Department of Bromathology and Food Technology,  
University of Cordoba, Campus of Rabanales,  
14071 Cordoba, Spain  
e-mail: teresa.sanchez@uco.es

D. Pérez-Marín (✉)  
Department of Animal Production,  
University of Cordoba, Campus Rabanales,  
14071 Cordoba, Spain  
e-mail: dcperez@uco.es



At present, grape ripeness is mostly evaluated by laboratory analysis, using traditional physical/chemical methods to test representative grape samples obtained at regular intervals throughout the ripening period (Krstic et al. 2003; Iland et al. 2004). Analysis is aimed primarily at measuring sugar content, titratable acidity and malic acid content; secondary measurements include pH, 100-berry weight and tartaric acid content. The sample used has to be representative, i.e. it should provide the results that would be obtained if the whole plot were to be harvested at the same time (Blouin and Guimberteau 2000). In order to ensure representativity, measurements should be made on bunches selected alternately from sunny and shady positions and on berries taken from the outer and inner areas of the bunch (Moreno and Peinado 2010). However, laboratory analysis is still something of a bottleneck for the proper estimation of grape status, and there are a few published studies on variations in grape composition within a single bunch, due largely to data-collection constraints (Ben Ghazlen et al. 2010).

Visual inspection of bunches throughout ripening and up until harvest shows that berry colour changes considerably as a function of bunch position on the vine; even within a single bunch, berry colour may vary substantially depending on the degree of exposure to the sun (Blouin and Guimberteau 2000). Moreover, sugar content is highest on grapes growing higher on the bunch, close to the stalk, and gradually declines down the bunch; acid content displays the reverse pattern (Hidalgo 2006).

Of the various analytical techniques available, near-infrared (NIR) spectroscopy has shown considerable potential for the non-destructive measurement of internal attributes and ripeness in fruits (Nicolăi et al. 2007; Sánchez and Pérez-Marín 2011). Over the last few years, moreover, the development of handheld near-infrared devices has enhanced the potential of NIR spectroscopy for the in situ monitoring and analysis of the fruit ripening process (Pérez-Marín et al. 2009; Sánchez et al. 2011).

However, no published studies have yet focused on the use of miniaturised, handheld, near-infrared devices based on micro-electro-mechanical system (MEMS) technology in grapes as a means of characterising variations in on-vine ripening as a function of grape position and bunch orientation, with a view to optimising harvesting times and thus enabling selective harvesting depending on the type of wine to be made. This was the purpose of the present study.

## Materials and Methods

### Grape Sampling During Ripening

The experiment was carried out in 2008, in a vineyard belonging to the Agricultural Research and Training Centre in Cabra

(Cordoba, Spain). Two grape (*Vitis vinifera* L.) varieties were selected: one white (cv. Pedro Ximénez) and one red (cv. Cabernet Sauvignon), both grown under regulated deficit irrigation. For each variety, two bunches were selected from each of six selected vines, giving a total of 24 bunches (12 white and 12 red). Bunches were labelled and analysed by NIR spectroscopy on the vine throughout the ripening process.

Spectrum collection started on 20 August. On-vine measurements were made every 3 or 4 days (except for the second measurement, which was made 6 days after the first) until harvest (9 Sept); a total of six measurements were made during the ripening process. NIR spectra were captured from samples taken from selected bunches using the handheld MEMS spectrometer; bunches from adjacent vines were then collected for physical–chemical analysis, in order to provide reference values for the properties measured. On arrival at the laboratory, grapes were promptly placed in refrigerated storage at 0 °C and 95% relative humidity. Prior to each physical–chemical measurement, samples were allowed to stabilise at laboratory temperature (25 °C).

### Spectra Collection

Spectra were collected on grapes in reflectance mode ( $\log 1/R$ ) using a handheld MEMS spectrometer (Phazir 2400, Polychromix, Inc., Wilmington, MA, USA). The Phazir 2400 is an integrated near-infrared handheld analyser that incorporates all the essential components to deliver on-vine applications (Geller and Ramani 2005). The spectrophotometer scans at 8-nm intervals (pixel resolution, 8 nm and optical resolution, 12 nm), across a range of NIR wavelengths from 1,600 to 2,400 nm. Sensor integration time is 600 ms.

Each of the twelve bunches selected for each variety was divided into three areas (high, middle and low), and four spectra were captured for each area to reflect orientation (north, south, east and west).

Since measurements were made on the vine, sample temperature was not controlled beforehand; mean temperature on measurement days ranged from 22 to 29 °C. Spectral acquisition was performed in sunlight, i.e. no light-tight box was used.

### Reference Data Analysis

Immediately after sampling, berries from adjacent vines were weighed on an electronic balance ( $0\text{--}320\pm 0.0001$  g; model C600-SX, Cobos, Barcelona, Spain) to determine the average 100-berry weight. Samples were then analysed for soluble solids content, reducing-sugar content, pH value, titratable acidity, tartaric acid and malic acid contents.

For this purpose, berries were passed through a hand-operated food mincer, which enabled constant pressure to be maintained during juice extraction with minimal seed and

skin shearing. The must was then centrifuged (Centronic 7000577, Selecta, Barcelona, Spain) to remove suspended solids. Soluble solids content ( $^{\circ}$ Brix) were measured using an Abbé-type refractometer (model B, Zeiss, Oberkochen, Würt, Germany). Reducing sugar content was measured by titration using an automatic titrator (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, Spain), using a modification of the Rebelein method (Rebelein 1971). Results were expressed as grams per litre. Must pH value and titratable acidity were measured using an automatic titrator (Crison Micro TT 2050, Crison, Alella, Barcelona, Spain); titratable acidity was measured by titration with 0.1 NaOH to an end point of pH 7.0. Results are expressed as grams per litre of tartaric acid (OJEU 2005). Tartaric acid was measured with a HP 8452 spectrophotometer (Hewlett Packard Corporation, Palo Alto, California, USA) as previously described by Rebelien (1969) and expressed as grams per litre of tartaric acid. Malic acid was measured using a portable RQflex reflectometer (model 16970, Merck Co., Darmstadt, Germany) using the enzyme method (MAPA 1993). Results were expressed as grams per litre of malic acid.

#### Data Processing

Chemometric analysis was performed using the Unscrambler software package version 9.1 (CAMO ASA, Oslo, Norway) and the WinISI II software package version 1.50 (Infrasoft International, Port Matilda, PA, USA).

Principal component analysis (PCA) was used to reduce the dimensionality of the data to a smaller number of components, to examine any possible grouping and to visualise the presence of outliers (Massart et al. 1988; Naes et al. 2002). PCA analysis was performed using the Unscrambler software. Pre-treatments consisted of Savitzky–Golay first derivative with a gap of six.

The PCA scores represent the weighted sums of the original variables without significant loss of useful information, and loadings (weighting coefficients) were used to identify major variables responsible for specific features appearing in the scores.

Scores for the first principal component (PC1) were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), using grape position, bunch orientation and the various ripening stages as factors. Means were compared using Tukey's test at  $P=0.05$ .

All data were analysed using the Minitab statistical software package version 15.1 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA).

#### Development of NIRS Classification Models

Discriminant models were constructed to classify grapes by ripening stage throughout the ripening process, using partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) for supervised

classification. Specifically, the PLS2 algorithm was applied, using the “discriminant equations” option in the WINISI II version 1.50 software package (ISI 2000).

Briefly, PLS-DA uses a training set to develop a qualitative prediction model which may subsequently be applied for the classification of new unknown samples. This model seeks to correlate spectral variations ( $X$ ) with defined classes ( $Y$ ), attempting to maximise the covariance between the two types of variable. In this type of approach, the  $Y$  variables used are not continuous, as they are in quantitative analysis, but rather categorical “dummy” variables created by assigning different values to the different classes to be distinguished (Naes et al. 2002).

In order to construct discriminant models to classify bunch spectra by ripening stage, six measurement dates during the ripening process were established for each variety. A total of 12 mean spectra (6 vines  $\times$  2 bunches) were thus obtained for each of the six dates analysed. The mean spectrum for each bunch was obtained by averaging the 12 spectral measurements made for that bunch (3 positions  $\times$  4 orientations). Spectral variations were correlated with the six categories established.

All models were constructed using full cross-validation (leave-one-out), suitable for small sample sets (Naes et al. 2002). A combined standard normal variate and detrending treatment was applied for scatter correction (Barnes et al. 1989), and four derivative mathematical treatments were tested in the spectral region 1,600–2,400 nm: 1,5,5,1; 2,5,5,1; 1,10,5,1; and 2,10,5,1, where the first number denotes the derivative order, the second denotes the number of data points in the segment used to calculate the derivative and the third and fourth numbers denote the number of data points over which running-average smoothing was conducted (Shenk and Westerhaus 1996).

A one-way ANOVA was subsequently performed for reducing-sugar content, an excellent indicator of the optimum harvesting time depending on the type of wine to be made, using ripening stage as factor. Means were compared using Tukey's test at  $p=0.05$ .

On the basis of the results obtained, ripening stages were grouped and new discriminant models were constructed to classify those bunches which could be harvested simultaneously for making a given type of wine.

## Results and Discussion

### Physical–Chemical Analysis

Physical–chemical changes taking place in adjacent grapes during on-vine ripening are shown in Table 1. A relatively wide range was covered for reducing-sugar content (165.99–211.19 g/l for white and 219.05–

**Table 1** Physical–chemical changes in ‘Pedro Ximénez’ and ‘Cabernet Sauvignon’ adjacent grapes during ripening

Variety	Ripening stage	Date	100-berry weight (g)	SSC (°Brix)	Reducing-sugar content (g/l)	pH value	Titrateable acidity (g/l tartaric acid)	Tartaric acid (g/l tartaric acid)	Malic acid (g/l malic acid)
Pedro Ximénez	M1	20 Aug	189.75	16.40	165.99	3.21	7.50	8.60	2.42
	M2	26 Aug	184.25	17.15	175.54	3.38	6.16	8.55	1.85
	M3	29 Aug	189.72	19.95	202.19	3.36	7.08	7.89	0.90
	M4	02 Sep	192.45	20.40	211.19	3.49	3.77	8.29	1.26
	M5	05 Sep	204.43	18.75	189.03	3.34	4.15	8.91	1.39
	M6	09 Sep	215.06	17.40	173.28	3.43	4.18	8.04	1.42
Cabernet Sauvignon	M1	20 Aug	80.79	21.50	219.05	3.30	4.50	11.01	3.30
	M2	26 Aug	63.77	24.10	246.53	3.49	5.30	9.06	3.00
	M3	29 Aug	66.78	26.00	262.88	3.49	4.23	7.71	2.80
	M4	02 Sep	71.78	26.25	268.80	3.55	4.92	9.15	2.73
	M5	05 Sep	82.36	24.30	249.94	3.50	4.59	8.59	2.71
	M6	09 Sep	88.25	23.80	239.81	3.59	4.29	9.39	2.36

SSC soluble solids content

268.80 g/l for red grapes) since sampling was carried out simultaneously for the two varieties throughout the ripening process.

Towards the end of veraison, a rapid berry-growth phase is observed due to cell enlargement prompted by the swift development of grape physical–chemical characteristics (Table 1). This is accompanied by a progressive increase in reducing-sugar content in vine shoots, leaves and fruits (Reynier 2003). Sugar content increases very rapidly in the berry during ripening, but the rate of increase slows down as ripening progresses, and stabilises at the moment of full ripeness; absolute values may even fall thereafter when the berry becomes overripe (Hidalgo 2006.)

Although the two varieties clearly differed in 100-berry weight and thus in berry size, trends over the ripening period were very similar. Red grape varieties tend to have a greater number of berries per bunch, thus favouring the steeping process during alcoholic fermentation, and 100-berry weight is considerably lower than for white varieties (Table 1).

Analysis of reducing-sugar content showed that ‘Pedro Ximénez’ grapes exhibited a ripening pattern different from that of ‘Cabernet Sauvignon’ grapes: at the start of the study, which was performed simultaneously for the two varieties, ‘Cabernet Sauvignon’ grapes were already approaching the final stage of ripeness, and sugar accumulation during the study period was comparatively slight. By contrast, ‘Pedro Ximénez’—a later variety—displayed the typical rise in reducing-sugar content during the early stages of ripening, although the last two measurements were affected by rainfall, and the ripeness levels expected for making Fino wines in the Montilla-Moriles region (Córdoba) were not in fact attained.

The optimal harvesting time for ‘Cabernet Sauvignon’ grapes used for making high-quality red wines is based on

an optimal balance of sugar content, colour, aromas and acidity. The best time for harvesting ‘Pedro Ximénez’ grapes, used for making high-quality young white wines, is the point of maximum aroma and acidity; this is usually achieved by earlier harvesting (Martínez-Valero et al. 2001). However, the same variety is also used for making Fino wines, for which the main requirement is a high reducing-sugar content (above 244 g/l); this is achieved by later harvesting. In order to determine the optimal harvesting time, it is therefore essential to analyse bunch ripening with a view to charting changes in major components.

Fluctuations in acidity-related parameters (titrateable acidity, tartaric and malic acid content) were due to a decline in grape acidity during ripening, as a result of the migration or consumption and dilution of these two predominant acids (Blouin and Cruege 2003). After veraison, tartaric acid content decreased only slightly, remaining virtually constant for both varieties, since variations in temperature during the ripening period were offset by vine water availability (Table 1). High temperatures tend to prompt increased respiratory combustion of tartaric acid, while the presence of moisture increases the levels of this acid in the bunch (Hidalgo 2006). By contrast, malic acid levels fell steadily throughout ripening, displaying a more marked decline when external temperatures were higher (López et al. 2009) (Table 1).

#### Influence of Position, Orientation and Ripening Stage on Bunch Ripeness

Principal component analysis was performed to examine the relationship between the various configurations of bunch orientation and grape position and ripening stages and the

spectral measurements recorded during on-vine ripening of red and white grapes.

Score plots for 'Pedro Ximénez' grapes are shown in Fig. 1. The first two principal components accounted for a high degree of variance (80.18 and 6.47%, respectively). In these plots, no grouping of samples by grape position (high, middle and low), by bunch orientation (north, south, east and west) or even by ripening stage (stages 1 to 6) were apparent.

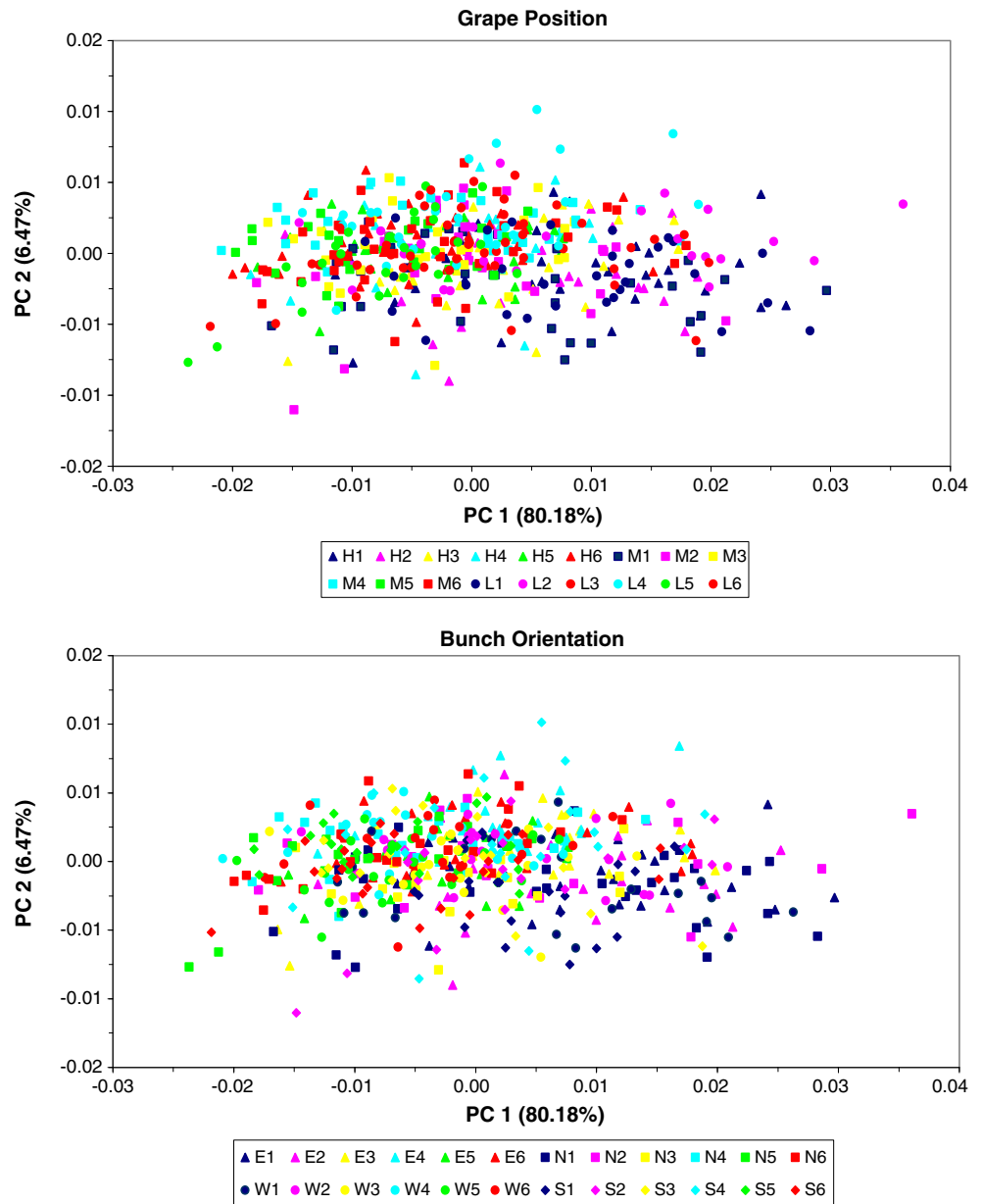
For 'Cabernet Sauvignon' grapes (data not shown), the first two principal components together accounted for 93.28% of total variance; PC1 accounted for 86.13% and PC2 for 7.15%.

Analysis revealed no apparent grouping by position, orientation or ripening stage.

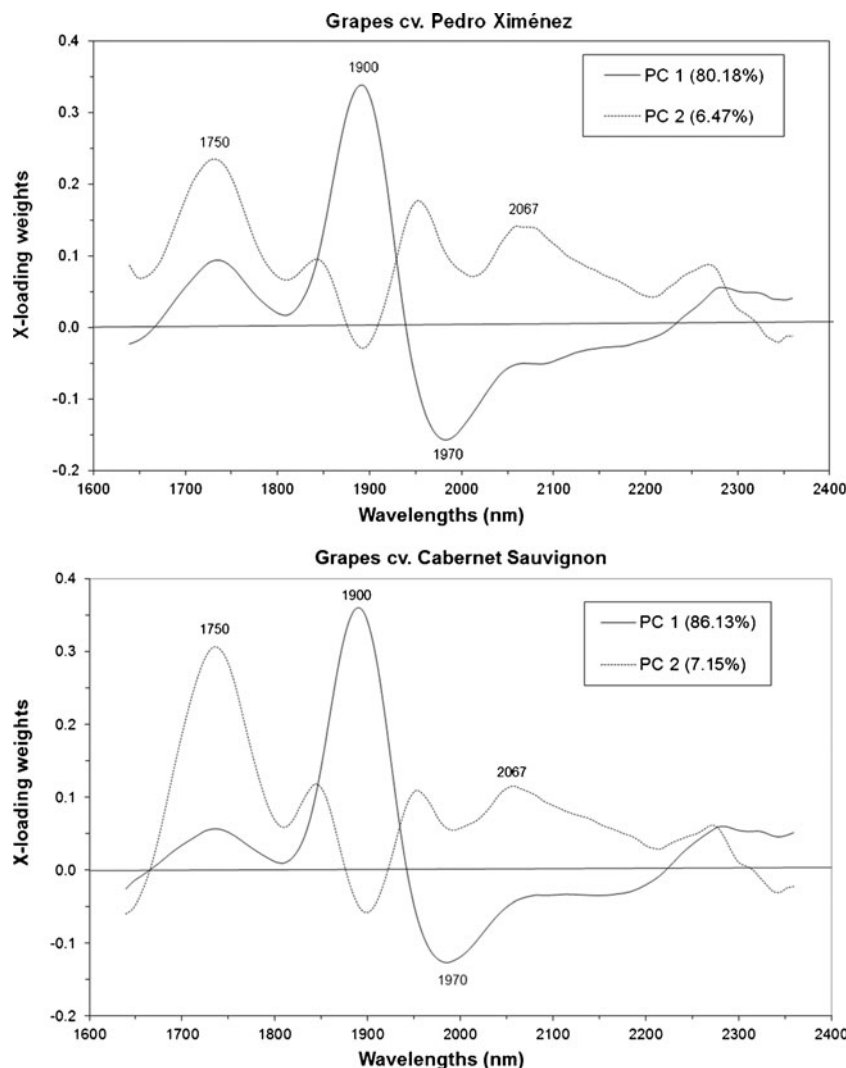
Loadings (weighting coefficients) for the two first principal components (Fig. 2) in both grape varieties showed that the key wavelengths for distinguishing between ripening stages were associated with the first sugar-related overtone at around 1,750 and 2,067 nm and with water peaks at around 1,900 and 1,970 nm (Williams 2001).

A statistical analysis was carried out in order to identify possible significant differences attributable to these three factors in both varieties throughout ripening. One-way ANOVA was performed on the first principal component for 'Pedro

**Fig. 1** Principal component analysis for bunch configuration during ripening in 'Pedro Ximénez' grapes



**Fig. 2** X-loading weights for ‘Pedro Ximénez’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grapes during ripening process



Ximenez’ grapes—which accounted for over 80% of variance in the sample set—taking orientation, position and ripening stage as factors (Table 2). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were found for all three factors: bunch orientation accounted for 2.77% of total variance in the first principal component, grape position for 1.90% and ripening stage for 17.35%. Tukey’s test distinguished the behaviour of east-facing bunches from that of bunches facing in other directions; the test also revealed significantly different behaviour ( $p < 0.05$ ) for grapes high on the bunch, compared with those in central or lower positions. Statistical analysis enabled three ripening stages to be distinguished ( $p < 0.05$ ): stages 1, 2 versus stages 3, 4 and versus stages 5, 6.

For ‘Cabernet Sauvignon’ grapes, the ANOVA revealed no significant differences ( $p > 0.05$ ) for the factors bunch orientation and grape position, which accounted for 0.40 and 0.01%, respectively, of variance; ripening stage, by contrast, accounted for 28.82% of total variance for the first principal component, with significant differences between stages ( $p < 0.05$ ). Tukey’s test for ripening stage enabled the following

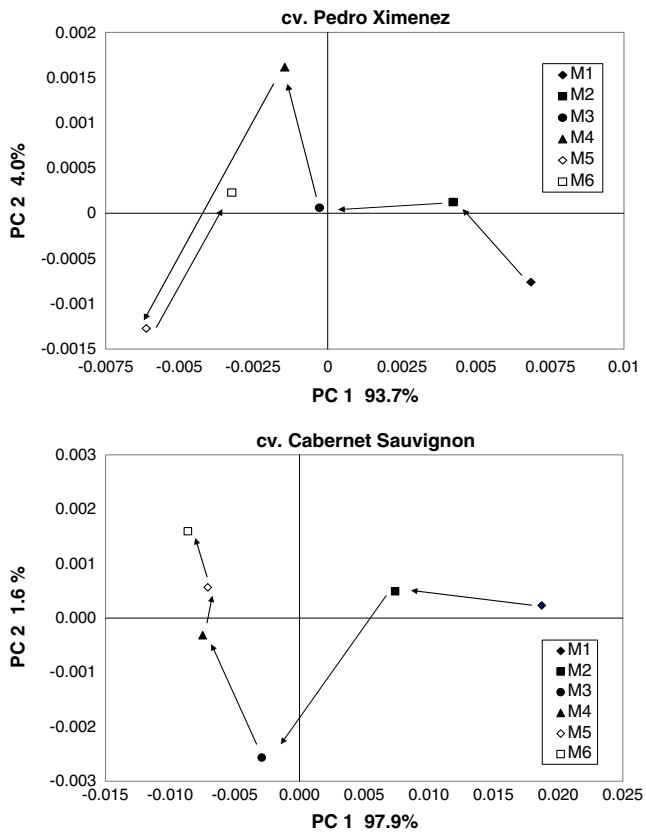
stages to be distinguished: stage 1; stage 2; stage 3 and stages 4, 5, 6 (data not shown).

**Table 2** Analysis of variance of the first principal component mean scores for raw spectra of whole bunches of ‘Pedro Ximénez’ grapes during ripening

Factor		PC1
Position	High	-0.0021 <sup>a</sup>
	Middle	0.0008 <sup>b</sup>
	Low	0.0015 <sup>b</sup>
Orientation	East	0.0031 <sup>a</sup>
	North	0.0013 <sup>b</sup>
	South	0.0011 <sup>b</sup>
	West	0.0010 <sup>b</sup>
Ripening stage	1st stage	0.0065 <sup>a</sup>
	2nd stage	0.0041 <sup>a</sup>
	3rd stage	0.0004 <sup>b</sup>
	4th stage	-0.0013 <sup>b</sup>
	5th stage	0.0063 <sup>c</sup>
	6th stage	0.0033 <sup>c</sup>

For each factor levels, column with differing superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ )

PCI first principal component



**Fig. 3** Principal component score plot based on average spectra for each stage of ripening in ‘Pedro Ximénez’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grapes. *Arrows* indicate ripening process

A new PCA was then performed using the mean spectrum for each ripening stage (Fig. 3). Components PC1 and PC2 accounted for 93.72 and 4.0%, respectively, of the variance

in the NIR spectra range (1,600–2,400 nm) for white grapes, and for 97.90 and 1.62% in the case of red grapes. PC1 mainly illustrated bunch development over the ripening period while PC2 may be related to bunch reducing-sugar content.

Discriminant Analysis for Classification by Ripening Stage

The ability of NIR technology to distinguish and thereby classify grape bunches by ripening stage using PLS-DA is shown in Table 3. The classification results are shown in the form of a confusion matrix. Numbers of correctly classified ripening stages are shown on the diagonal, whereas off-diagonal numbers denote misclassifications.

The models correctly classified 81% of white grapes and 86% of red grapes while the percentage of correctly classified samples by group was greater than 75% in all representative groups, except for the 4th and 3rd stages (67%) in ‘Pedro Ximénez’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grapes, respectively.

The results achieved with these discriminant models may be considered satisfactory, although they did not classify bunches by ripening stage with sufficient precision to enable selective harvesting at the optimal time depending on the type of wine to be made, largely because rainfall during ripening affected reducing-sugar content and thus the alcoholic strength of the future wine. For that reason, ANOVA and Tukey’s test were performed using reducing-sugar content as factor; this parameter has proved to be an excellent indicator of the optimal time for harvesting. The aim was to group ripening stages, in order to identify the grouping that best indicated

**Table 3** Classification results by PLS discriminant analysis at different ripening stages for ‘Pedro Ximénez’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grapes

Qualitative groups <sup>a</sup>	1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	3 <sup>rd</sup> stage	4 <sup>th</sup> stage	5 <sup>th</sup> stage	6 <sup>th</sup> stage
Pedro Ximénez						
1st stage	11	1	0	1	0	0
2nd stage	0	9	1	1	0	1
3rd stage	0	1	10	1	0	1
4th stage	0	0	1	8	1	0
5th stage	0	0	0	1	11	1
6th stage	1	1	0	0	0	9
Percentage correctly classified	92%	75%	83%	67%	92%	75%
Cabernet Sauvignon						
1st stage	12	1	0	0	0	0
2nd stage	0	10	2	0	0	0
3rd stage	0	0	8	1	0	0
4th stage	0	0	1	10	0	1
5th stage	0	1	1	0	12	1
6th stage	0	0	0	1	0	10
Percentage correctly classified	100%	83%	67%	83%	100%	83%

Full cross-validation procedure. Percentage correctly classified by the model after full cross-validation for the Pedro Ximénez variety: 81%. Number of factors, 13.

Percentage correctly classified by the model after full cross-validation for the Cabernet Sauvignon variety: 86%. Number of factors, 13

<sup>a</sup>Actual and predicted groups (ripening stage)

**Table 4** Classification results by PLS discriminant analysis for reducing-sugar content in 'Pedro Ximénez' and 'Cabernet Sauvignon' grapes

Full cross-validation procedure. Percentage correctly classified by the model after full cross-validation for both varieties, 88 %. Number of factors: 9  
<sup>a</sup>Actual and predicted groups (ripening stage)

Qualitative groups <sup>a</sup>	1 <sup>st</sup> stage	2 <sup>nd</sup> stage	3 <sup>rd</sup> stage	4 <sup>th</sup> stage
<b>Pedro Ximénez</b>				
1st group (stage 1)	11	0	1	0
2nd group (stages 2 and 6)	1	20	3	0
3rd group (stages 3 and 4)	0	3	20	0
4th group (stage 5)	0	1	0	12
Percentage correctly classified	92%	83%	83%	100%
<b>Cabernet Sauvignon</b>				
1st group (stage 1)	12	0	0	
2nd group (stages 2, 5 and 6)	0	32	5	
3rd group (stages 3 and 4)	0	4	19	
Percentage correctly classified	100%	89%	79%	

optimal harvesting times for the making of different types of wine using the varieties studied.

For white grapes, statistical analysis succeeded in reducing the number of groups from six to four: values for reducing-sugar content were similar at ripening stages 2 and 6 (Table 1) so these were merged in Tukey's test. The same applied to stages 3 and 4. The merging of stages 2 and 6 may be attributed to weather conditions: rainfall led to water absorption in stages 5 and 6, increasing berry weights. Increased water content in turn prompted a drop in reducing-sugar levels (Table 1).

When the same procedure was applied to red grapes, Tukey's test reduced the number of groups from six to three, reflecting a difference in the behaviour of reducing-sugar content with respect to white grapes (Table 1). Stages 2, 5 and 6 were merged into one group, and stages 3 and 4 into another, leaving stage 1 alone in its group. This grouping by reducing-sugar levels can again be attributed to rainfall prior to the measurement of stage 5.

The results obtained with the best classification models, using PLS-DA and various mathematical treatments, for predicting the optimal time for harvesting depending on the type of wine to be made are shown in Table 4.

The models correctly classified 88% of white grapes and 88% of red grapes while the percentage of correctly classified samples by group was greater than 83% in all representative groups, except for the 3rd stage in 'Cabernet Sauvignon' grapes (79%).

These classification results were better than those obtained earlier (Table 3), both generally and individually, for both varieties. In the case of 'Pedro Ximénez' grapes, bunches could be distinguished by ripening level as: insufficiently ripe (1), optimally ripe (2 and 6), and overripe (3, 4 and 5) for the making of young white wines. However, rainfall during ripening prevented sufficiently precise identification of ripeness levels for making Fino wines in the Montilla-Moriles area (Córdoba).

'Cabernet Sauvignon' grape bunches were also sufficiently distinguished by ripeness to enable selective harvesting for making young red wines (1), vintage reds (2, 5 and 6) and even sweet reds (3 and 4).

The good classification accuracy achieved suggests that the NIR spectral range (1,600–2,400 nm) contains information enabling reducing-sugar content to be distinguished and predicted, thus identifying optimal times for harvesting depending on the type of wine to be produced.

There are few references in the scientific literature to NIR spectroscopy-based models for classifying white and red grapes by ripening stage. In the only paper addressing this issue, Le Moigne et al. (2008) constructed models for classifying 'Cabernet Franc' grapes by ripeness stage, using a Foss-NIR Systems 6500 spectrophotometer in the spectral range 400 a 2,500 nm; because of its specific features, this instrument cannot be used for in-situ monitoring of grape bunches. The models correctly classified between 73.4 and 83% of samples for each of the plots tested; these percentages are lower than those obtained here (88% for both varieties). The poorest individual classification percentages were also worse than those obtained here: 63 vs. 83 and 79%, respectively, for white and red grapes. Finally, grouping in the present study was based not on time but rather on reducing-sugar content, a much more reliable indicator for determining optimal harvesting time as a function of the wine to be made.

## Conclusions

The overall results sufficiently demonstrate that NIR spectroscopy using a handheld NIR-MEMS spectrometer has excellent potential for the field monitoring and evaluation of grapes (berry by berry) as a function of on-vine ripening stage.

Principal component analysis of the spectral data obtained in situ during ripening highlighted differences

as a function of grape position on the bunch (high versus middle and low) and bunch orientation (E versus N, S and W) during ripening. The results obtained using the classification models suggest that NIRS technology enables the selective harvesting of grape bunches depending on the type of wine to be made. To our knowledge, this is the first attempt to implement NIR spectroscopy on-vine for this purpose.

## References

- Barnes RJ, Dhanoa MS, Lister SJ (1989) Standard normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl Spectrosc* 43:772–777
- Ben Ghazlen N, Cerovic ZG, Germain C, Toutain S, Latouche G (2010) Non-destructive optical monitoring of grape maturation by proximal sensing. *Sensors* 10:10040–10068
- Blouin J, Cruège J J (2003) *Analyse et Composition des Vins: Comprendre le Vin* (Analysis and composition of wines: understanding wine). Dunod, Paris, In French
- Blouin J, Guimberteau J (2000) *Maturation et Maturité des Raisins* (Grape ripening and ripeness). Féret, Bordeaux, In French
- Bramley RGV (2005) Understanding variability in winegrape production systems 2. Within vineyard variation in quality over several vintages. *Aust J Grape Wine Res* 11:33–42
- Geller Y, Ramani M (2005) MEMS based digital transform spectrometers. In: Mascher P, Knights AP, Cartledge JC, Plant DV (eds) *Proceedings of SPIE, Photonic applications in devices and communication systems*. vol. 5970, pp 306–312
- Hidalgo J (2006) *La Calidad del Vino desde el Viñedo* (Wine quality from the vineyard). Mundi-Prensa, Madrid, In Spanish
- Iland P, Bruer N, Edwards G, Weeks S, Wilkes E (2004) *Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts*. Patrick Iland Wine Promotions, Campbelltown
- ISI (2000) *The complete software solution using a single screen for routine analysis, robust calibrations, and networking*. Manual. FOSS NIRSystems/TECATOR, Infrasoft International, LLC, Silver Spring
- Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals JM, De Freitas V, Zamora F (2011) Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem* 124:767–774
- Krstic M, Moulds G, Panagiotopoulos B, West S (2003) Growing quality grapes to winery specifications: quality measurement and management options for grapegrowers. Cooperative Research Centre for Viticulture Publisher, Adelaide
- Le Moigne M, Maury C, Bertrand D, Jourjon F (2008) Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Qual Prefer* 19:220–231
- López MI, Sánchez MT, Ramírez P, Morales J (2009) Effect of a deficit irrigation regime on the quality of wines made from white grapes (*Vitis vinifera* L.) grown in semiarid areas. *J Food Qual* 32:481–503
- MAPA (Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) (1993) *Official Methods for the Analysis of Wines*. Secretaría General de Alimentación, vol II. Dirección General de Política Alimentaria, Madrid, pp 35–319
- Martínez-Valero R, Melgarejo-Moreno P, Martínez-Nicolás JJ, Hernández-García F, Martínez-Font R (2001) *Prácticas Integradas de Viticultura* (Integrated practices of viticulture). Mundi-Prensa-AMV Ediciones, Madrid, In Spanish
- Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SM, Michotte Y, Kaufman L (1988) *Chemometrics: a textbook*. Elsevier, Amsterdam
- Moreno J, Peinado RA (2010) *Química Enológica* (Enological chemistry). Mundi-Prensa-AMV Ediciones, Madrid, In Spanish
- Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies A (2002) *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*. NIR Publications, Chichester
- Nicolaï BM, Beullens K, Bobelyn E, Peirs A, Saeys W, Theron KI, Lammertyn J (2007) Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: a review. *Postharvest Biol Technol* 46:99–118
- Official Journal of the European Union (OJEU) (2005) Commission Regulation (EC) No 1293/2005 of 5 August 2005 amending Regulation (EEC) No 2676/90 determining community methods for the analysis of wines. *Off J L* 205:12–15, 6 of August
- Pérez-Marín D, Sánchez MT, Paz P, Soriano A, Guerrero JE, Garrido-Varo A (2009) Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on-tree ripening and post-harvest storage. *Postharvest Biol Technol* 52:180–188
- Rebelein H (1969) *Dosage rapide de l'acide tartrique*. Office International de la Vigne et du Vin, Feuillet Vert 431
- Rebelein H (1971) Correction de l'acidité des moûts et des vins. *Bull del' OIV* 480:136–141
- Reynier A (2003) *Manuel de Viticulture* (Handbook of viticulture). Lavoisier, Paris, In French
- Ruiz-Hernández M (2001) *Las Variedades de Vid y la Calidad de los Vinos* (Vine varieties and wine quality). Mundi Prensa-AMV Ediciones, Madrid, In Spanish
- Sánchez MT, Pérez-Marín D (2011) Nondestructive measurement of fruit quality by NIR spectroscopy. In: Vázquez M, Ramírez JA (eds) *Advances in post-harvest treatments and fruit quality and safety*. Nova Science Publishers, Inc, Hauppauge, pp 101–163
- Sánchez MT, De La Haba MJ, Guerrero JE, Garrido-Varo A, Pérez-Marín D (2011) Testing of a Local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. *Postharvest Biol Technol* 60:130–135
- Shenk JS, Westerhaus MO (1996) Calibration the ISI way. In: Davies AMC, Williams PC (eds) *Near infrared spectroscopy: the future waves*. NIR Publications, Chichester, pp 198–202
- Torchio F, Cagnasso E, Gerbi V, Rolle L (2010) Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Anal Chim Acta* 660:183–189
- Williams PC (2001) Implementation of near-infrared technology. In: Williams PC, Norris KH (eds) *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*. AACC Inc, St. Paul, pp 145–169





**4.4. FEASIBILITY OF USING A MINIATURE NIR SPECTROMETER TO  
MEASURE VOLUMIC MASS DURING ALCOHOLIC FERMENTATION.  
INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD SCIENCES AND NUTRITION 62,  
353–359 (2011)**



## Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation

JUAN FERNÁNDEZ-NOVALES<sup>1</sup>, MARÍA-ISABEL LÓPEZ<sup>1</sup>,  
VIRGINIA GONZÁLEZ-CABALLERO<sup>1</sup>, PILAR RAMÍREZ<sup>1</sup>, & MARÍA-TERESA SÁNCHEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Formación Agraria de Cabra-Priego, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Cabra (Córdoba), Spain, and <sup>2</sup>Department of Bromatology and Food Technology, University of Cordoba, Campus of Rabanales, Cordoba, Spain

### Abstract

Volumic mass—a key component of must quality control tests during alcoholic fermentation—is of great interest to the winemaking industry. Transmittance near-infrared (NIR) spectra of 124 must samples over the range of 200–1,100-nm were obtained using a miniature spectrometer. The performance of this instrument to predict volumic mass was evaluated using partial least squares (PLS) regression and multiple linear regression (MLR). The validation statistics coefficient of determination ( $r^2$ ) and the standard error of prediction (SEP) were  $r^2 = 0.98$ ,  $n = 31$  and  $r^2 = 0.96$ ,  $n = 31$ , and SEP = 5.85 and 7.49 g/dm<sup>3</sup> for PLS and MLR equations developed to fit reference data for volumic mass and spectral data. Comparison of results from MLR and PLS demonstrates that a MLR model with six significant wavelengths ( $P < 0.05$ ) fit volumic mass data to transmittance ( $1/T$ ) data slightly worse than a more sophisticated PLS model using the full scanning range. The results suggest that NIR spectroscopy is a suitable technique for predicting volumic mass during alcoholic fermentation, and that a low-cost NIR instrument can be used for this purpose.

**Keywords:** NIR spectroscopy, wine, volumic mass, partial least squares, multiple linear regression, miniature NIR spectrometer

### Introduction

The transformation of must into wine is a complex biological phenomenon known as alcoholic fermentation, in which the sugar in the must is transformed, through the action of microorganisms, into alcohol and carbon dioxide (Peynaud 2000). The fermentation process also gives rise to the formation of a number of minority compounds, including glycerol, succinic acid, volatile acids (acetic acid), higher alcohols (isoamyl alcohol), acetaldehyde, lactic acid and esters (Troost 1990, Peynaud 2000).

When making white wine, the must obtained by crushing and pressing the grapes is directly submitted to alcoholic fermentation. In making red wines, however, the grapes are destalked and crushed, and the mass is then placed in vats in which alcoholic fermentation takes place simultaneously with maceration of skin and seeds.

Although many factors play a key role in the fermentation process—as noted in studies by Cozzolino et al. (2006) and Zeaiter et al. (2006)—the main parameter requiring monitoring during alcoholic fermentation of white wines is must density or volumic mass. In red wine fermentation, monitoring must also include density, temperature, volatile acidity and yeast populations, whilst during maceration the total polyphenol index and the degree of color extraction needs to be followed closely (Ruiz-Hernández 1991).

Efficient monitoring of volumic mass is essential in the wine industry, in order to avoid stuck fermentation and potential refermentation, both of which may lead to serious changes in the physical/chemical characteristics of the end product, detectable by the taster (Fernández-Navales et al. 2008).

Correspondence: María-Teresa Sánchez, Department of Bromatology and Food Technology, University of Cordoba, Campus of Rabanales, 14071 Cordoba, Spain. Tel: 34 957 212576. Fax: 34 957 212000. E-mail: teresa.sanchez@uco.es

Near-infrared (NIR) spectroscopy is based on the absorption of radiation in the wavelength region 780–2,500-nm by molecular bonds of the type X–H, where X represents carbon, nitrogen or oxygen atoms. This absorption is mainly caused by vibration and by the folding, stretching or deformation of these bonds (Shenk and Westerhaus 1995a, Miller 2001). The NIR spectrum is based on absorbance values at different wavelengths in the spectral range in question, changes in the response of the NIR spectrum being proportional to changes in the concentration of chemical components, or physical characteristics, of the sample to be analyzed (Shenk et al. 1992, Burns and Ciurczak 2001, 2008).

NIR spectroscopy is proving to be a suitable technique for the non-destructive analysis of food products, and is ideally suited to the requirements of the agrofood industry in general, and the wine industry in particular, in terms of both quality control and traceability: it requires little or no sample preparation; it is both flexible and versatile (applicable to multi-product and multicomponent analysis); it generates no waste; it is less expensive to run than conventional methods; and it can be built into the processing line, enabling large-scale individual analysis and real-time decision-making (Osborne et al. 1993, Shenk and Westerhaus 1995a).

NIR spectroscopy is increasingly being used as a fast, reliable, low-cost method for the non-destructive analysis of major qualitative and quantitative parameters in the wine industry (Cozzolino et al. 2004, 2006, Liu et al. 2007, Skorgerson et al. 2007, Fernández-Novales et al. 2008, 2009, 2010, Yu et al. 2009). A recent paper by Di Egidio et al. (2010) reports on the application of near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopy instead of NIR and MIR spectroscopy for predicting sugars (glucose and fructose), alcohols (ethanol and glycerol) and phenolic compounds (total polyphenols, total anthocyanins and flavonoids), in order to enable real-time monitoring of changing concentrations of these components during red wine fermentation, using Fourier transform (FT)-NIR and FT-IR instruments.

Low-cost NIR instruments can be developed for incorporation into the processing line, since they combine fast, accurate measurement with considerable versatility, simplicity of sample presentation, facilitating real-time decision-making during the production process (determination of process endpoint, uniform blending of varieties, etc.). Clearly, more can be done to optimize the design and the use of this type of NIR sensor in the winery industry. To date, only one study has addressed the development of low-cost NIR instrument for monitoring the fermentation of white and red wines: Fernández-Novales et al. (2009) designed a simple, efficient and low-cost instrument to predict changes in reducing sugars during ripening, winemaking and ageing of red and white wines, identifying the optimum fingerprint

spectra strongly associated with reducing sugar content in grapes, musts and wines.

The present study sought to assess the feasibility of using a miniature low-cost NIR spectrometer to predict volumic mass in red and white wines during alcoholic fermentation and to identify the most significant wavelengths associated with volumic mass, with a view to support instrument developers in the design of even more simple and inexpensive miniature spectrometers.

## Materials and methods

### Sample set

The sample set for this study comprised 124 samples of different varieties of white grapes (“Albariño”, “Macabeo”, “Moscatel”, “Pedro Ximénez”, “Semillon” and “Sylvaner”) and red grapes (“Bobal”, “Cabernet Franc”, “Monastrel”, “Pietro Picudo”, “Pinot Noir” and “Tempranillo”) obtained from fermentation trials conducted from 2006 to 2008 at the Agricultural Research and Training Centre in Cabra (Córdoba, Spain).

Grapes were harvested manually, and transported in perforated plastic crates (capacity 20 kg); every effort was made to avoid deterioration of grapes, and thus loss of must and quality impairment. On arrival at the winery, white grapes were crushed and pressed, and then pumped into small-scale temperature-controlled fermentation tanks (50 l); red grapes were destemmed, crushed, and pumped into similar tanks.

Musts were inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (71B, Uvaferm) previously rehydrated following the manufacturer’s instructions. Samples were taken at random from the start to the end of the fermentation process. A total of 66 white-grape and 58 red-grape samples were taken from microfermenters at controlled temperatures of 18°C and 25°C, respectively.

All samples were clarified by centrifugation, filtered through 5 µm nylon filters and analyzed using both the reference method and NIR spectroscopy.

### Reference analysis and spectrum collection

Volumic mass was measured by areometry (Official Journal of the European Union 2005). Results were expressed as g/dm<sup>3</sup>. Samples were analyzed in duplicate and the standard error of laboratory (SEL) was estimated from these duplicates (SEL = 0.91 g/dm<sup>3</sup>).

After reference analysis in the laboratory, NIR spectra were collected using a HR-2000 spectrophotometer (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA). This is a high-resolution miniature instrument comprising a light source, fiber optic cables, a peristaltic pump, a 50 mm pathlength cuvette, and a computer for data collection. It works over a wavelength range from 200 to 1,100 nm, taking scans at 0.5 nm intervals, with an average of 300 scans per spectrum. Instrument performance was checked daily following the

diagnostic protocols provided by the manufacturer, using distilled water as the reference spectrum. However, in order to avoid a low signal-to-noise ratio, only spectral data between 800 and 1,050 nm were used for subsequent analysis.

Spectral data were collected using OOIBase32 version 2.0 operating software (Ocean Optics Inc.) and stored as the logarithm of the reciprocal of transmittance; that is,  $\log(1/T)$ .

#### Calibration and validation sets

The selection of the calibration and validation samples is one of the critical steps when developing a calibration equation. Of the various strategies available for selecting both sets of samples (Windham et al. 1989), structured population selection based solely on spectral information was used.

Principal component analysis (PCA) was performed using the Unscrambler 9.1 software package (CAMO ASA, Oslo, Norway). Once each sample in the global set ( $n = 124$ ) was ordered by its spectral distance (from shorter to longer) to the center of the global population, the outlier spectra samples were eliminated ( $n = 10$ ). The remaining sample set (114 samples) was divided into two subsets: a calibration and cross-validation set comprising 83 samples (73%), and an external validation set containing 31 samples (27%), formed by selecting one in every four samples from the initial set, ensuring that each subset contained a representative range of samples from various stages of fermentation (Table I).

#### Chemometric data treatment

Chemometric data management was performed using the Unscrambler 9.1 software package (CAMO ASA).

Calibration models obtained for the prediction of volumic mass were compared using two regression methods: partial least squares regression (PLS) with full cross-validation (leave-one-out), used for validation and to avoid overfitting the calibration model (Martens and Naes 1989; Naes et al. 2002); and multiple linear regression (MLR), in which the wavelengths proving most significant ( $P < 0.05$ ) for the analysis of volumic mass were selected.

Calibrations were generated using different mathematical pretreatments: smoothing average, multiplicative scatter correction and derivatives (applying Savitzki–Golay and Norris algorithms).

The statistics used to select the best models both for PLS and for MLR were: coefficient of determination for calibration ( $R^2$ ), standard error of calibration (SEC), coefficient of determination for cross-validation ( $r^2$ ) and standard error of cross-validation (SECV). A good model should have a low SEC, a low SECV and high determination coefficients, but also a small difference between SEC and SECV (Shenk and Westerhaus 1995b, Williams 2001). The root mean square error of cross-validation (RMSECV) was used to determine the number of latent variables (Martens and Naes 1989).

Other statistics used were: residual predictive deviation (RPD) or ratio of standard deviation of the original data (SD) to SECV; the RER or ratio of range of the original data (maximum – minimum value) to SECV; and the coefficient of variation (CV) or ratio of SECV to the mean value of the reference data of the studied parameter for the training set. These statistics enable SECV to be standardized, facilitating the comparison of the results among calibrations sets of different mean values for the constituent of interest (Williams 2001).

External validation of the best calibration models obtained was performed using a set comprising 31 samples not included in the calibrations. External validation of the model is based on the determination of a known significant error (bias), and an unexplained significant error, termed the standard error of performance (SEP) (Windham et al. 1989).

Although several authors have reported that the SECV gives a realistic estimate of the standard error of performance of samples not included in the calibration (Meuret et al. 1993, Shenk and Westerhaus 1996, Martens and Dardenne 1998), this step is necessary to obtain an independent measurement of the robustness of the equation expressed as the SEP (Windham et al. 1989).

Acceptable models, as indicated earlier, should have low SECV and SEP, a high determination coefficient ( $r^2$ ) and small differences between SECV and SEP. Large differences between SECV and SEP indicate that too many latent variables have been introduced in the model and that data noise is also being modeled. A relatively low number of latent variables is generally desirable to avoid modeling noise signals. The minimum plot of the root mean square error of prediction of the parameter in question against the number of latent variables was used to determine the optimal number of latent variables (Shao et al. 2007).

Table I. Characterization of complete sample set, calibration set and validation set.

Parameter	Item	Complete sample set ( $n = 124$ )	Calibration set ( $n = 83$ )	Validation set ( $n = 31$ )
Volumic mass ( $\text{g}/\text{dm}^3$ )	Range	986.00–1,108.00	986.00–1,108.00	986.40–1,095.00
	Mean	1,024.70	1,021.72	1,020.92
	SD	37.30	35.24	35.63
	CV (%)	3.64	3.45	3.49

Data ranges, means and standard deviations (SDs) and coefficients of variation (CVs).

The robustness of prediction models was evaluated with reference to the control limits suggested by Shenk et al. (1989), who note that the control limit for SEP should be equal to  $1.30 \times \text{RMSEC}$  (root mean square error of calibration) whilst the limit for bias should be  $\pm 0.60 \times \text{RMSEC}$ .

## Results and discussion

### Overview of spectral features

Typical first-derivative spectra ( $D_1 \log(1/T)$ ) for white and red wines during fermentation are shown in Figure 1. In the NIR region between 700 and 800 nm, absorbance spectra for white wines differed considerably from those of red wines; white-wine spectra were practically flat, whereas red-wine spectra displayed a marked slope. In the 800–1,060 nm region, both types of spectra displayed a similar trend, although absorbance values were higher for white than for red wines. The inverted peak at 953 nm was related to the third overtone of the O–H bond (Murray 1986, McGlone and Kawano 1998). Williams (2001) and Cynkar et al. (2009) report a strong water-absorption band at 970–1,000 nm, visible here in Figure 1, which may be expected to predominate, since grapes are 85–90% water (Peynaud 2000).

### Development of calibration models for predicting volumic mass

The results obtained for the best calibration model, applying PLS regression, are shown in Table II. An excellent model with four latent variables and using the Norris first derivative “1,3,1,1”—where the first digit is the number of the derivative, the second is the gap over which the derivative is calculated, the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing—was obtained for the prediction of volumic mass during alcoholic fermentation.

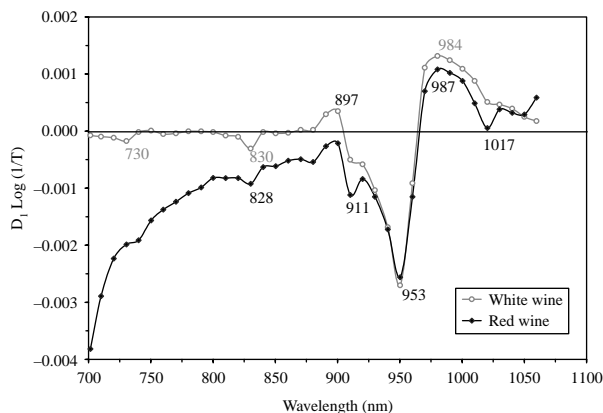


Figure 1. Typical  $D_1 \log(1/T)$  spectra for white and red wines during alcoholic fermentation.

Table II. Statistics for the best calibration and cross-validation model for predicting volumic mass during alcoholic fermentation.

Parameter	Sample number ( $n = 83$ )				Calibration				Cross-validation				
	Mean	SD	Range	LV	$R^2$	RMSEC	SEC	$r^2$	RMSECV	SEC	RPD	RER	CV
Volumic mass ( $\text{g}/\text{dm}^3$ )	1,021.72	35.24	986.00–1,108.00	4	0.98	5.16	5.19	0.96	6.47	6.51	5.41	18.74	0.64

Mean and standard deviation (SD) are those of the calibration set. LV, number of latent variables; RPD, ratio of SD/SEC; RER, ratio of range/SEC.

The model accounted for 96.63% of the variation in the reference population for volumic mass; Shenk and Westerhaus (1996) suggest that an  $r^2$  value greater than 0.9 indicates excellent quantitative information. The results for volumic mass (0.96) thus indicate that the model will provide excellent quantitative information.

The SECV value ( $6.51 \text{ g/dm}^3$ ) must be viewed in association with the SD and range of the parameter studied. As a guideline, Williams and Sobering (1996) recommend that the RPD ratio (SD/SECV) should be close to 3, and that the RER ratio (range/SECV) should be 10 or higher. The best model obtained for predicting volumic mass yielded an RPD ratio of 5.41 and an RER of 18.74 (i.e. values well within the recommended range).

Similar findings for volumic mass (RPD = 6.36 and RER = 29.70) are reported by Urbano-Cuadrado et al. (2004) in various types of dry wines. The predictive ability of the model ( $r^2 = 0.96$ ; SECV =  $6.51 \text{ g/dm}^3$ ; RPD = 5.41 and RER = 18.74) proved slightly lower than that reported by Fernández-Novales et al. (2008) for volumic mass only in white-wine fermentation ( $r^2 = 0.98$ ; SECV =  $4.22 \text{ g/dm}^3$ ; RPD = 8.32 and RER = 28.90). For red wines, however, Fernández-Novales et al. (2010) reported results of  $r^2 = 0.94$ ; SECV =  $8.71 \text{ g/dm}^3$ ; RPD = 4.43 and RER = 11.83 for the same parameter; that is, lower than those obtained with the present model.

### External validation

Validation of the best prediction model obtained was performed using the external validation set comprising samples not used for calibration purposes.

Figure 2 shows NIR-predicted values, applying PLS regression, together with the values obtained with the reference method for measuring volumic mass, using both the calibration and validation sets. The coefficient of determination ( $r^2$ ) and SEP were 0.98 and  $5.85 \text{ g/dm}^3$ , respectively. Examination of the validation statistics shown in Figure 2 suggests that the values obtained for SECV and SEP for the

prediction of volumic mass during alcoholic fermentation of white and red wines by NIR spectroscopy are very similar, confirming that SECV provides a reliable estimator of SEP, although slightly higher than SEL.

SEP and bias values for this model were lower than the control limits suggested in 1989 by Shenk et al. (control limit for SEP =  $6.71 \text{ g/dm}^3$  and for bias =  $\pm 3.10 \text{ g/dm}^3$ ), indicating the robustness of the model for predicting volumic mass. The results confirm that NIR spectroscopy and PLS provide a satisfactory method for measuring changes in volumic mass in white and red wines during alcoholic fermentation.

### Analysis of most significant wavelengths using MLR

When interpreting the prediction results using PLS regression, the contribution of individual wavelengths was not taken into account, since model construction with PLS generally uses the whole range of wavelengths covered by the NIR instrument. However, in order to support instrument developers in the design of even more simple and inexpensive miniature spectrometers, it would clearly be useful to know which individual wavelengths contribute most to the prediction of volumic mass; this would also enable a better understanding of wine spectroscopy during fermentation. To that end, NIR models to predict volumic mass were constructed using MLR.

PLS regression using the 83-sample set and cross-validation with four latent variables yielded a cumulative reliability of 86% for variable X and 99% for variable Y, suggesting a possible relationship between individual wavelengths and volumic mass.

Prior to building model MLR-1, a selection was made of the wavelengths in the PLS model displaying the highest absolute loading-weight values in the spectral region 800–1,050 nm.

The MLR-1 model was constructed using the 22 initially-selected wavelengths (804, 836, 848, 863, 895, 909–910, 937–938, 949, 953–954, 961, 981, 997, 1,002–1,003, 1,017, 1,028, 1,032–1,033,

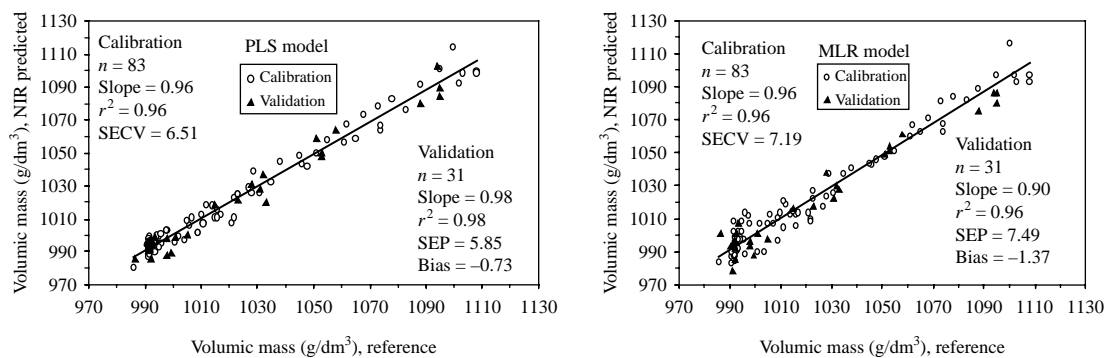


Figure 2. NIR-predicted values versus reference values for volumic mass during alcoholic fermentation, using calibration and validation sets.



1,048 nm), which constituted the group of independent variables, the dependent variable being volumic mass. The significance ( $P < 0.05$ ) of the contribution of each wavelength to the development of predictive models for volumic mass was determined by analysis of variance test. The wavelengths  $X_5$  (895 nm),  $X_6$  (909 nm),  $X_7$  (910 nm),  $X_{10}$  (949 nm),  $X_{13}$  (961 nm) and  $X_{16}$  (1,002 nm) were all deemed significant; the remainder were not significant ( $P > 0.05$ ).

A new model (MLR-2) was therefore constructed using only the optimal or most sensitive wavelengths (895, 909, 910, 949, 961, and 1,002 nm), with the mathematical function:

$$Y = 1,011.55 - 22,541.0 X_5 + 15,669.3 X_6 \\ + 26,535.1 X_7 - 27,488.2 X_{10} + 24,744.8 X_{13} \\ - 6,472.9 X_{16}$$

Wavelengths 894–896 nm have been associated with volumic mass by Fernández-Novales et al. (2008, 2010), whilst wavelengths 909 and 910 nm are related to the third overtone of the C–H bond (Murray 1986, Osborne et al. 1993). The 949 nm wavelength has also been associated with volumic mass (Fernández-Novales et al. 2008), and finally wavelengths 961 and 1,002 nm are related to the third overtone of the O–H bond (Williams 2001).

The regression model was statistically significant at the 95% confidence level, so the six wavelengths (spectral variables) were selected as correlating strongly with volumic mass.

The calibration and prediction results of the MLR-2 model are shown in Figure 2. The model displayed high correlation ( $r^2 = 0.96$ ;  $0.96$ ), together with satisfactory SECV ( $7.19 \text{ g/dm}^3$ ) and SEP ( $7.49 \text{ g/dm}^3$ ) for calibration and prediction models, respectively. As expected, the six-wavelength model produced equations slightly less accurate than those obtained with the PLS model, which used the whole spectral range (800–1,050 nm) as independent variables. However, the values obtained for RPD (4.90) and RER (16.97) indicate that the model obtained using a low-cost NIR instrument is sufficiently accurate to be used by the wine industry for monitoring alcoholic fermentation.

Comparison of the results obtained here with those reported by Fernández-Novales et al. (2009) when using the same equipment to measure reducing-sugar content during ripening, winemaking and ageing of white and red wines shows that some of the wavelengths identified by these authors as significant ( $P < 0.05$ ) because of their strong correlation with reducing sugars (909, 951, 961 and 975 nm) were also significant here ( $P < 0.05$ ) for the prediction of volumic mass during fermentation of white and red wines.

It would therefore be feasible to design a low-cost NIR instrument to simultaneously measure both these key parameters, for use in quality control by the wine industry.

## Conclusions

These results indicate that NIR spectroscopy is sensitive to physical/chemical changes (decrease in volumic mass) taking place during alcoholic fermentation, across the spectral range 800–1,050 nm. PLS and MLR regression models yielded robust equations with low errors of prediction, based on transmittance spectra and volumic mass measurements during fermentation. Six wavelengths (895, 909, 910, 949, 961, and 1,002 nm) were identified as correlating strongly with volumic mass, and could be used to develop a simple, efficient, low-cost instrument that could also be used to measure reducing-sugar content in wines throughout fermentation.

**Declarations of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Burns DA, Ciurczak EW. 2001. Handbook of Near-infrared Analysis. New York: Marcel Dekker.
- Burns DA, Ciurczak EW. 2008. Handbook of Near-infrared Analysis. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Cozzolino D, Kwiatkowski MJ, Parker M, Cynkar WU, Damberg RG, Gishen M, Herderich MJ. 2004. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentation by visible and near infrared spectroscopy. *Anal Chim Acta* 513:73–80.
- Cozzolino D, Parker M, Damberg RG, Herderich M, Gishen M. 2006. Chemometrics and visible-near infrared spectroscopy monitoring of red wine fermentation in a pilot scale. *Biotechnol Bioeng* 95:1101–1107.
- Cynkar W, Cozzolino D, Damberg RG. 2009. The effect of sample storage and homogenization techniques on the chemical composition and near infrared spectra of white grapes. *Food Res Int* 42:653–658.
- Di Egidio V, Sinelli N, Giovanelli G, Moles A, Casiraghi E. 2010. NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *Eur Food Res Technol* 230: 947–955.
- Fernández-Novales J, López MI, Sánchez MT, García JA, Morales J. 2008. A feasibility study on the use of a miniature fiber optic NIR spectrometer for the prediction of volumic mass and reducing sugars in white wine fermentations. *J Food Eng* 89: 325–329.
- Fernández-Novales J, López MI, Sánchez MT, Morales J, González-Caballero V. 2009. Shortwave-near infrared spectroscopy for non destructive determination of reducing sugars at stages of grape ripening, winemaking and aging of white and red wines. *Food Res Int* 42:285–291.
- Fernández-Novales J, Sánchez MT, López MI, García-Mesa JA, Ramírez P. 2010. Feasibility of using a miniature fiber optic ultraviolet-visible-near infrared spectrometer to assess total polyphenol index, color intensity and volumic mass in red wine fermentations *J Food Process Eng* in press, DOI: 10.1111/j.1745-4530.2009.00530.x.
- Liu F, He Y, Wang L, Pan H. 2007. Feasibility of the use of visible and near infrared spectroscopy to assess soluble solids content and pH of rice wines. *J Food Eng* 83:430–435.

- Martens H, Naes T. 1989. *Multivariate Calibration*. Chichester: John Wiley & Sons. p 419.
- Martens HA, Dardenne P. 1998. Validation and verification of regression in small data sets. *Chemometr Intell Lab Syst* 44: 99–121.
- McGlone VA, Kawano S. 1998. Firmness, dry matter and soluble solids assessment of postharvest kiwifruit by NIR spectroscopy. *Postharvest Biol Technol* 13:131–141.
- Meuret M, Dardenne P, Biston R, Poty O. 1993. The use of NIR in predicting nutritive value of Mediterranean tree and shrub foliage. *J Near Infrared Spec* 1:45–54.
- Miller CE. 2001. Chemical principles of near-infrared technology. In: Williams P, Norris K, editors. *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2nd ed. St Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. p 19–37.
- Murray I. 1986. The NIR spectra of homologous series of organic compounds. In: Hollo J, Kaffka KJ, Gonczy JL, editors. *Near Infrared Diffuse Reflectance/Transmittance Spectroscopy*, Proceedings International NIR/NIT Conference. Budapest: Akademiai Kiado. p 13–28.
- Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies A. 2002. *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester, UK: NIR Publications.
- Official Journal of the European Union. 2005. Commission regulation (EC) 387 No 1293/2005 of 5 August 2005 amending regulation (EEC) No 2676/90 388 determining community methods for the analysis of wines. *Official J L* 389 205 (6 August): 12–15.
- Osborne BG, Fearn T, Hindle PH. 1993. Practical NIR spectroscopy with applications. In: Osborne BG, Fearn T, Hindle PH, editors. *Food and Beverage Analysis*. London: Longman Scientific and Technical. p 1–12.
- Peynaud E. 2000. *Enología Práctica*. 3rd ed. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Ruiz-Hernández M. 1991. *Vinificación en tinto*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Shao Y, He Y, Gómez AH, Pereir AG, Qiu Z, Zhang Y. 2007. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato “Heatwave” (*Lycopersicon esculentum*) quality characteristics. *J Food Eng* 81:672–678.
- Shenk JS, Westerhaus MO. 1995a. *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Silver Spring, MD: NIRSystems, Inc.
- Shenk JS, Westerhaus MO. 1995b. *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*. Silver Spring, MD: NIRSystem, Inc.
- Shenk JS, Westerhaus MO. 1996. Calibration the ISI way. In: Davies AMC, Williams PC, editors. *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Chichester, UK: NIR Publications. p 198–202.
- Shenk JS, Westerhaus MO, Abrams SM. 1989. Protocol for NIR calibrations: Monitoring analysis results and recalibration. In: Martens GC, Shenk JS, Barton II FE, editors. *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. Agriculture Handbook No. 643. Washington, DC: USDA-ARS, US Government Printing Office. p 104–110.
- Shenk JS, Workman J, Westerhaus M. 1992. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In: Burns DA, Ciurczak EW, editors. *Handbook of Near-infrared Analysis*. Practical Spectroscopy Series, 13. New York: Marcel Dekker. p 383–431.
- Skogerson K, Downey M, Mazza M, Boulton R. 2007. Rapid determination of phenolic components in red wines from UV-Visible spectra and the method of partial least squares. *Am J Enol Viticult* 58:318–325.
- Troost G. 1990. *Tecnología del Vino*. Barcelona, España: Omega.
- Urbano-Cuadrado M, De Castro MDL, Pérez-Juan PM, García-Olmo J, Gómez-Nieto MA. 2004. Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology determination or screening of fifteen parameters in different types of wines. *Anal Chim Acta* 527:81–88.
- Windham WR, Mertens DR, Barton II FE. 1989. Protocol for NIRS calibration: Sample selection and equation development and validation. In: Martens GC, Shenk JS, Barton II FE, editors. *Near Infrared Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*, Agriculture Handbook No. 643. Washington, DC: USDA-ARS, US Government Printing Office. p 96–103.
- Williams PC. 2001. Implementation of near-infrared technology. In: Williams PC, Norris KH, editors. *Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. St Paul, MN: AACC. p 145–169.
- Williams PC, Sobering DC. 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: Davies AMC, Williams P, editors. *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. Chichester, UK: NIR Publications. p 185–188.
- Yu H, Niu X, Lin H, Ying Y, Li B, Pan X. 2009. A feasibility study on on-line determination of rice wine composition by Vis-NIR spectroscopy and least-squares support vector machines. *Food Chem* 113:291–296.
- Zeiter M, Roger JM, Bellon-Maurel V. 2006. Dynamic orthogonal projection. A new method to maintain the on-line robustness of multivariate calibrations, applications to NIR-based monitoring of wine fermentations. *Chemometr Intell Lab* 80:227–235.



## **Capítulo 5**



---

## Chapter 5. CONCLUSIONS

The main conclusions that can be drawn based on the research carried out, the proposed strategies and the results obtained during the development of this Doctoral Thesis are:

1. Given the natural variation between individual grapes bunches, it is necessary to develop models using a database sufficiently large to reflect the spectral variability that may be encountered during on-vine ripening and at the reception level in the wineries, with a view to improving the specificity, accuracy and robustness of the predictions obtained. [*The following conclusion has been drawn from the articles: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. Sensors 11 (2011), 6109-6124; “Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation”. International Journal of Food Sciences and Nutrition (2011), 353-359; y “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. Food Analytical Methods 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3*].
2. NIRS technology using the bunch as sample presentation—a method that requires no previous sample preparation— displayed a predictive capacity similar to those recorded using traditional NIRS presentation modes (berries and must), for evaluating internal quality characteristics related to sugar content and acidity, for the non-destructive quantification of chemical changes taking place during on-vine ripening, and for deciding on the optimum time for harvesting. [*The following conclusion has been drawn from the articles: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. Sensors 11 (2011), 6109-6124; “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared*

- Spectroscopy*". *Food Analytical Methods* 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3].
3. Analysis of grapes in bunch form should be considered a first step in the tuning of NIRS technology for on-site and on-line control purposes, since it is the form in which the grape grows, and in which it arrives at the winery. This methodology allows musts to be processed separately depending on initial grape quality, assessed with a single spectrum measurement and in a matter of seconds. [The following conclusion has been drawn from the articles: "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 (2010), 158-165; "Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening". *Sensors* 11 (2011), 6109-6124; "On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy". *Food Analytical Methods* 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3].
  4. The high-speed operation of the diode-array spectrophotometer used provides the opportunity to acquire spectral information from relatively large surface areas of the bunches in a short time, thus enabling its application for on-line analysis for sweetness-related parameters, using the Modified Partial Least Squares (MPLS) regression method. [The following conclusion has been drawn from the articles: "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 (2010), 158–165; "Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening". *Sensors* 11 (2011), 6109-6124].
  5. In comparison with MPLS regression, the LOCAL algorithm proved to be a highly effective tool for improving the prediction of internal quality parameters in intact grapes, with particularly good results for acidity-related parameters and potassium content. [The following conclusion has been drawn from the article: "Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening". *Sensors* 11 (2011), 6109-6124].

6. NIR spectroscopy is sensitive to physical/chemical changes (decrease in volumic mass) taking place during alcoholic fermentation, across the spectral range 800–1,050 nm. Six wavelengths (895, 909, 910, 949, 961, and 1,002 nm) were identified as correlating strongly with volumic mass, and could be used to develop a simple, efficient, low-cost instrument that could also be used to measure reducing-sugar content in wines throughout fermentation. [*The following conclusion has been drawn from the article: “Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation”. International Journal of Food Sciences and Nutrition (2011), 353-359*].
7. Differences as a function of grape position on the bunch (high versus middle and low) and bunch orientation (East versus North, South and West) during ripening have been detected using a handheld NIR-MEMS spectrometer. Moreover, analysis of bunch spectral characteristics have enabled three stages of ripening to be distinguished: early, middle and late, pointing out that NIRS technology permits the selective harvesting of grape bunches depending on the type of wine to be made. [*The following conclusion has been drawn from the article: “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. Food Analytical Methods 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3*].
8. NIR spectroscopy using a handheld NIR-MEMS spectrometer has excellent potential for the field monitoring and evaluation of grapes (berry by berry) as a function of on-vine ripening stage. [*The following conclusion has been drawn from the article: “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. Food Analytical Methods 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3*].
9. The constant and ongoing improvement of NIRS instruments, and particularly the development of latest-generation devices based on diode-array and MEMS technology, has enhanced the potential of NIRS as a tool for the on-site monitoring and quality control in the enological industry. [*The following conclusion has been drawn from the articles: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. *Sensors* 11 (2011), 6109-6124; “Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation”. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (2011), 353-359; “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. *Food Analytical Methods* 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3].

10. Application of NIRS in the enological industry will enable increased sampling of each batch produced, thus ensuring a more precise and accurate guarantee of specific quality. As a result, rapid decisions can be taken regarding the optimum harvesting time, and fruit arriving at the winery can be swiftly streamed, allowing batches to be processed separately depending on initial grape quality. However, NIRS analysis of grape faces particular challenges and difficulties, due to high moisture content and considerable variability both in external appearance and in physical/chemical composition; as a result, the technology on which today’s NIRS instruments are based still needs to be adapted and optimised in order to facilitate its transfer and implementation in the enological sector. [The following conclusion has been drawn from the articles: “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 (2010), 158-165; “Evaluation of different regression strategies for internal quality control of grape bunches during on-vine ripening”. *Sensors* 11 (2011), 6109-6124; “Feasibility of using a miniature NIR spectrometer to measure volumic mass during alcoholic fermentation”. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (2011), 353-359; “On-vine monitoring of grape ripening using Near Infrared Spectroscopy”. *Food Analytical Methods* 2012. DOI 10.1007/s12161-012-9389-3].

## **Capítulo 6**



---

## Capítulo 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcalá, M. 2006. Utilización de la Espectroscopía NIR en el Control Analítico de la Industria Farmacéutica. Desarrollos Iniciales en PAT. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Anderssen, R.S., Osborne, B.G., Wesley I.J. 2003. The application of localisation to near infrared calibration and prediction through partial least squares regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 11, 39-48.
- Arana, I., Jarén, C., Arazuri, S. 2005. Maturity, variety and origin determination in white grapes (*Vitis vinifera* L.) using NIRS. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13, 349-357.
- Baggiolini, M. 1952. Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Revue Romande d'Agriculture et d'Arboriculture* 8, 4-6.
- Balsari, P., Scienza, A. 2004. Formas de Cultivo de la Vid y Modalidades de Distribución de los Productos Fitosanitarios. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Bao, Y.F., Wang, X.F., Liu, G.L., Li, G., Lin, L. 2012. NIR detection of alcohol content based on GA-PLS. In: Hou, Z. (Ed.), 4<sup>th</sup> International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation. January 6-7, 2012, Sanya, China, pp. 200-204.
- Barton II, F.E., Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., Funk, D.B. 2000. The development of near infrared wheat quality models by locally weighted regressions. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 8, 201-208.
- Ben-Gera, I., Norris, K.H. 1968a. Direct spectrophotometric determination of fat and moisture in meat products. *Journal of Food Science* 33, 64-67.
- Ben-Gera, I., Norris, K.H. 1968b. Determination of moisture content in soybeans by direct spectrophotometry. *Journal of Agricultural Research* 18, 125-132.
- Benson, I.B. 2003. Near infrared absorption technology for analysing food composition. In: Lees, M. (Ed.), *Food Authenticity and Traceability*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England, pp. 101-130.
- Bertran, E., Blanco, M., MasPOCH, S., Ortiz, M.C., Sánchez, M.S., Sarabia, L.A. 1999. Handling intrinsic non-linearity in near-infrared reflectance spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 49, 215-224.

- Bertrand, D. 2000. Instrumentation. In: Bertrand, D., Dufour, E. (Eds.), *La Spectroscopie Infrarouge et Ses Applications Analytiques*. TEC & DOC Editions, Paris, France, pp. 221-241.
- Bertrand, D. 2001. Near infrared spectroscopy and its applications for feed quality control. In: Van der Poel, A.F.B., Váhl, J.L., Kwakkel, R.P. (Eds.), *Advances in Nutritional Technology. Proceedings of the 1<sup>st</sup> World Feed Conference*. Wageningen Pers, The Netherlands, pp. 11-30.
- Blouin, J., Guimberteau, G. 2004. *Maduración y Madurez de la Uva*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- BOJA. 1985. Orden de 11 de noviembre de 1985, por la que se aprueba el nuevo Reglamento de la Denominación de Origen «Montilla-Moriles» y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía No. 125, 31/12/1985.
- BOJA. 2000. Orden de 19 de octubre de 2000, por la que se establecen las normas de aplicación de las ayudas del régimen de reestructuración y reconversión del viñedo. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía No. 123, 26/10/2000.
- BOJA. 2011. Orden de 30 de noviembre de 2011, por la que se aprueban los Pliegos de Condiciones de los Vinos de la Tierra «Altiplano de Sierra Nevada», «Bailén», «Cádiz», «Córdoba», «Cumbres del Guadalfeo», «Desierto de Almería», «Laderas del Genil», «Laujar-Alpujarra», «Los Palacios», «Norte de Almería», «Ribera del Andarax», «Sierras de Las Estancias y Los Filabres», «Sierra Norte de Sevilla», «Sierra Sur de Jaén», «Torreperogil» y «Villaviciosa de Córdoba». Boletín Oficial de la Junta de Andalucía No. 249, 22/12/2011.
- Burns, D.A., Ciurczak, E.W. 1992. *Handbook of Near Infrared Analysis*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.
- Burns, D.A., Ciurczak, E.W. 2001. *Handbook of Near Infrared Analysis*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- Caprara, C., Pezzi F. 2010. Application of NIR technique for food safety evaluation during the grapes delivery in the cellar. In: *Work Safety and Risk Prevention in Agro-food and Forest Systems. International Conference Ragusa SHWA2010 - September 16-18. Ragusa Ibla Campus- Italy*, pp. 563-568.
- Casale, M., Oliveri, P., Armanino, C., Lanteri, S., Forina, M. 2010. NIR and UV-VIS spectroscopy, artificial nose and tongue: Comparison of four fingerprinting techniques for the characterisation of Italian red wines. *Analytica Chimica Acta* 668, 143-148.

- 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, 72-83.
- Chauchard, F., Codgill, R., Roussel, S., Roger, J.M., Bellon-Meurel, V. 2004. Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 71, 141-150.
- Ciurczak, E.W. 2001. Principles of Near-Infrared Spectroscopy. In: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 7-9.
- Coates, J., Ramani, M. 2006. NIR and an economical handheld analyzer. *The Process Engineer*, pp. 9-15.
- Comisión Europea. 2011. Agricultura y Desarrollo Rural. Reforma del Sector Vitivinícola. [http://ec.europa.eu/agriculture/capreform/wine/index\\_es.htm](http://ec.europa.eu/agriculture/capreform/wine/index_es.htm). Accesible: 4 de abril de 2012.
- Cozzolino, D., Smyth, H.E., Gishen, M., 2003. Feasibility study on the use of visible and near-infrared spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7703-7708.
- Cozzolino, D., Esler, M.B., Damberg, R.G., Cynkar, W.U., Boehm, D.R., Francis, I.L., Gishen, M. 2004. Prediction of colour and pH in grapes using a diode array spectrophotometer (400-1100 nm). *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 12, 105-111.
- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Janik, L., Gishen, M. 2005. Effect of both homogenisation and storage on the spectra of red grapes and on the measurement of total anthocyanins, total soluble solids and pH by visual near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 13, 213-223.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Janik, L., Damberg, R.G., Gishen, M. 2006. Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14, 279-289.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Damberg, R.G., Janik, L., Gishen, M. 2007. Near Infrared Spectroscopy in the Australian Grape & Wine Industry. Cooperative Research Center for Viticulture. Technology Application Note- April.

- Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Mercurio, M.D., Smith, P.A. 2008. Measurement of condensed tannins and dry matters in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least square. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17, 7631-7636.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., Smith, P. 2011a. Technical solutions for analysis of grape juice, must, and wine: the role of infrared spectroscopy and chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 1475-1484.
- Cozzolino, D., Cynkar, W., Shah, N., Smith, P. 2011b. Quantitative analysis of minerals and electric conductivity of red grape homogenates by near infrared reflectance spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture* 77, 81-85.
- Crisosto, C.H., Mitchell, F.G. 2007. Factores precosecha que afectan la calidad de frutas y hortalizas. In: Kader, A. (Ed.), *Tecnología Poscosecha de Productos Hortofrutícolas*. 3ª Edición. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, USA, pp. 55-62.
- Cynkar, W., Cozzolino, D., Damberg, R.G. 2009. The effect of sample storage and homogenisation techniques on the chemical composition and near infrared spectra of white grapes. *Food Research International* 42, 653-658.
- Dahm, D.J., Dahm, K.D. 2001. The physics of near-infrared scattering. In: Williams P., Norris, K. (Eds.), *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2<sup>nd</sup> Edition. America Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 1-18.
- Damberg, R.G., Kambouris, A., Gishen, M., Francis, I.L. 1999. Measuring fruit quality. In: *Modern Viticulture- Meeting Market Expectations; Proceedings of the Australian Society of Viticulture and Oenology: Winetitles, Adelaide*. pp. 45-47.
- Damberg, R.G., Cozzolino, D., Esler, M.B., Cynkar, W.U., Kambouris, A., Francis, I.L., Høj, P.B., Gishen, M. 2003. The use of near infrared spectroscopy for grape quality measurement. *The Australian Grapegrower & Winemaker* 473, 69-76.
- Damberg, R.G., Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Janik, L., Gishen, M. 2006. The determination of red grape quality parameters using the LOCAL algorithm. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 14, 71-79.
- Day, D.R., Butler, M.A., Smith, M.C., McAllister, A., Deutsch, E.R., Zafiriou, K., Senturia, S.D. 2005. Diffractive-MEMS implementation of a hadamard near-infrared spectrometer. *TRANSDUCERS'05. The 13<sup>th</sup> International Conference*

- on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Vol. 2. Seoul, Korea, pp. 1246-1249.
- Denteil, A. 1998. Aspectos Científicos y Tecnológicos del Color del Vino. Tarragona, España.
- Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) n° 1293/2005 de la Comisión, de 5 de Agosto de 2005, que modifica el Reglamento (CEE) n 2676/90 por el que se determinan los Métodos de Análisis Comunitarios Aplicables en el Sector del Vino. DOUE de 6 de Agosto de 2005, n° 3, pp. 12-15.
- Downey, G. 1994. Tutorial review. Authentication of food and food ingredients by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 4, 47-61.
- Downey, G. 1996. Review. Qualitative analysis in near-infrared region. *The Analyst* 119, 2367-2375.
- Downey, G. 2000. Discriminant PLS-questions and answers from a list server. *NIRNews* 11, 9-12.
- Downey, G., Boussion, J. 1996. Coffee authentication by near infrared spectroscopy. In: Davies, A.M.C., Williams, P. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. NIR Publications, Chichester, UK, pp. 410-415.
- Fadock, M. 2011. Non-Destructive VIS-NIR Reflectance Spectrometry for Red Wine Grape Analysis. PhD Thesis. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Fearn, T., Davies, A.M.C. 2003. Locally-biased regression. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 11, 467-478.
- Ferrer-Gallego, R., Hernandez-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailon, M.T. 2011. Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology* 44, 847-853.
- Flanzy, C. 2003. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. AMV Ediciones & Mundi Prensa, Madrid, España.
- Francis, L., Høj, P., Dambergs, R., Gishen, M., de Barros Lopes, M., Godden, P., Henschke, P., Waters, E., Herderich, M., Pretorius, I. 2005. Objective measures of grape quality – are they achievable? *The Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 20, 12-18.
- Garrido, A. 1997. Current and future applications of NIRS technology. *Options Méditerranéennes* 26, 87-92.



- Garrido-Varo, A., De Pedro, E. 2007. The role of Near-Infrared Spectroscopy in verifying label information in agro-forestry products. In: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*. 3<sup>rd</sup> Edition. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida: CRC Press, USA, pp. 387-398.
- García, J. 2002. Clasificación y Autenticación de Canales de Cerdo Ibérico mediante Espectroscopía en el Infrarrojo Cercano (NIRS). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España.
- Geladi, P. 2003. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 58, 767-782.
- Generalitat de Catalunya. 2010. Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para las Explotaciones Vitícolas. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, Barcelona, España.
- Gishen, M., Damberg, B. 1998. Some preliminary trials in the application of scanning near infrared spectroscopy (NIRS) for determining the compositional quality of grapes, wine and spirits. *The Australian Grapegrower & Winemaker* 414, 43-45, 47.
- Gishen, M., Iland, P.G., Damberg, R.G., Esler, M.B., Francis, I.L., Kambouris, A., Johnstone, R.S., Høj, P.B. 2002. Objective measures of grape and wine quality. In: Blair, R.J., Williams, P., Høj, P.B. (Eds.), *Proceedings of the 11<sup>th</sup> Australian Wine Industry Technical Conference; 7-11 October 2001*. Australian Wine Industry Technical Conference Inc., Adelaide, SA., pp. 188-194.
- 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, 158-165.
- González-Caballero, V., Pérez-Marín, D., López, M.I., Sánchez, M.T. 2011. Optimization of NIR spectral data management for quality control of grape bunches during on-vine ripening. *Sensors* 11, 6109-6124.
- Guidetti, R., Beghi, R., Bodria, L. 2010. Evaluation of grape quality parameters by a simple Vis/NIR system. *Transactions of the ASABE* 53, 477-484.
- Herrera, J., Guesalaga, A., Agosin, E. 2003. Shortwave-near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes. *Measurement Science and Technology* 14, 689-697.

- Hernández, J. 2005. El papel del suelo en la calidad del vino. In: García, I., Suarez, AM (Eds.), *Actas de la Cultura del Vino, Primer Congreso Peninsular*. 10-12 mayo 2002, O Barco de Valdeorras, Orense, España.
- Heise, H.M., Winzen, R. 2002. *Chemometrics in Near-Infrared Spectroscopy*. In: Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 125-162.
- Hidalgo, L. 2002. *Poda de la Vid*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Hidalgo, L. 2006. *Tratado de Viticultura General*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- ICEX (Instituto Español de Comercio Exterior). 2011. *El Vino en Cifras*. <http://www.spainbusiness.com/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4528042>. Accesible: 4 de abril de 2012.
- ISI. 2000. *The Complete Software Solution Using a Single Screen for Routine Analysis, Robust Calibrations, and Networking; Manual*. FOSS NIRSystems/TECATOR. Infrasoft International, LLC, Sylver Spring MD, USA.
- Jackson, J.E. 1991. *A User's Guide to Principal Components*. John Wiley and Sons. New York, NY, USA.
- Janik, L.J., Cozzolino, D., Damberg, R., Cynkar, W., Gishen, M. 2007. The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neuronal networks. *Analytica Chimica Acta* 594, 107-118.
- Jarén, C., Ortuño, J.C., Arazuri, S., Arana, J.I., Salvadores, M.C. 2001. Sugar determination in grapes using NIR technology. *International Journal of Infrared and Millimeter Waves* 22, 1521-1530.
- Karoui, R., Downey, G., Blecker, Ch. 2010. Mid-Infrared Spectroscopy coupled with chemometrics: a tool for the analysis of intact food systems and the exploration of their molecular structure-quality relationships—a review. *Chemical Reviews* 110, 6144-6168.
- Katayama, K., Komaki, K., Tamiya, S. 1996. Prediction of starch, moisture, and sugar in sweetpotato by near infrared transmittance. *HortScience*, 31, 1003-1006.
- Kawano, S. 2002. Sampling and sample presentation. In: Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy. Principles, Instruments, Applications*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 115-124.

- Kemps, B., León, L., Best, S., De Baerdemaeker, J., De Ketelaere, B. 2010. Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering* 105, 507-513.
- Kennedy, A.M. 2002. An Australian case study: introduction of new quality measures and technologies in the viticultural industry. In: Blair, R.J., Williams, P.J., Høj, P.B. (Eds.), *Proceedings of the 11<sup>th</sup> Australian Wine Industry Technical Conference*. Adelaide, SA; Winetitles, pp. 199-206.
- Koehler, F.W., Lee, E., Kidder, L.H., Lewis, E.N. 2002. Near infrared spectroscopy: the practical chemical imaging solution. *Spectroscopy Europe* 14, 112-119.
- Kramer, R., Workman, J., Reeves III, J.B. 2004. Qualitative analysis. In: Roberts, C.A., Workman, J., Reeves III, J.B. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 175-206.
- 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, 294-302.
- Le Moigne, M., Chantal, M., Bertrand, D., Jourjon, F. 2008. Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Quality and Preference* 9, 220-231.
- Liu, L., Cozzolino, D., Cynkar, W.U., Damberg, R.G., Janik, L., O'Neill, B.K., Colby, C.B., Gishen, M. 2008. Preliminary study on the application of visible–near infrared spectroscopy and chemometrics to classify Riesling wines from different countries. *Food Chemistry*, 106, 781-786.
- López, M.I., Sánchez, M.T., Díaz, A., Ramírez, P., Morales, J. 2007. Influence of a deficit irrigation regime during ripening on berry composition in grapevines (*Vitis vinifera* L.) grown in semiarid areas. *International Journal of Food Science and Nutrition* 58, 491–507.
- López, M.I., Sánchez, M.T., Ramírez, P., Morales, J. 2009. Effect of a deficit irrigation regime on the quality of wines made from white grapes (*Vitis vinifera* L.) grown in semiarid areas. *Journal of Food Quality* 32, 481-503.
- MAPA (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación). 1993. *Métodos Oficiales de Análisis de Vinos*. Secretaría General de Alimentación, Volumen II. Dirección General de Política Alimentaria, Madrid, España, pp. 35–319.

- Mark, H., Workman, J. 1991. *Statistics in Spectroscopy*. Academic Press, Inc., Burlington, MA, USA.
- Martens, M. 1999. A philosophy for sensory science. *Food Quality and Preference* 10, 233-244.
- Martens, H., Naes, T. 1989. *Multivariate Calibration*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Martínez, R., Melgarejo, P., Hernández, F., Martínez, J.J., Salazar, D.M., Martínez, R. 2001. *Prácticas Integradas de Viticultura*. AMV Ediciones & Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Martínez de Toda, F. 2008. *Claves de la Viticultura de Calidad: nuevas técnicas de estimulación y control de la calidad de la uva en el viñedo*. 1ª Edición. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Martínez de Toda, F. 2011. *Claves de la Viticultura de Calidad: nuevas técnicas de estimulación y control de la calidad de la uva en el viñedo*. 2ª Edición. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). 2008. Informe Línea L1: Diagnóstico de los Factores que Merman la Competitividad de las Pymes Agroalimentarias. Anexo C. Análisis del Subsector Vinos. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). 2010. Anuario de Estadística 2010. Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). 2011. Anuario de Estadística 2011. Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid, España.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.M., Michotte, Y., Kaufman, L. 1988. *Chemometrics: a textbook. Data Handling in Science and Technology* 2. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- McClure, W.F. 2003. 204 years of near infrared technology: 1800–2003. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 11, 487-518.

- McElhinney, J., Downey, G. 1999. Chemometric processing of visible and near infrared reflectance spectra for species identification in selected raw homogenised meats. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 7, 145-154.
- Menessati, P. 2007. In-field spectrophotometric measurement to estimate maturity stage of wine grapes. Optics for natural resources, agriculture and foods II. In: Chenn, Y.R., Meyer, G.E. (Eds.), *Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers. SPIE/International Society for Optical Engineering*, Bellingham, WA, USA, pp. 76118.
- Miller, C.E. 2001. Chemical principles of near-infrared technology. In: Williams, P., Norris, K. (Eds.), *Near Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. 2<sup>nd</sup> Edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 19-37.
- Mladenov, M., Draganova, T., Tsenkova, R., Mustafa, M. 2012. Quality assessment of grain samples using spectra analysis. *Biosystems Engineering* 111, 251-260.
- Moreno, J., Peinado, R.A. 2010. *Química Enológica*. Mundi-Prensa-AMV Ediciones, Madrid, España.
- Murray, I. 1999. NIR spectroscopy of food: simple things, subtle things and spectra. *NIRNews* 10, 10-12.
- Murray, I., Aucott, L.S., Pike, H.I. 2001. Use of discriminant analysis on visible and near infrared reflectance spectra to detect adulteration of fishmeal with meat and bone meal. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 9, 297-311.
- Murray, I., Cowe, I. 2004. Sample preparation. In: Roberts, C.A., Workman, J., Reeves, J.B. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy in Agriculture*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA, pp. 75-115.
- Naes, T., Indahl, U. 1998. A unified description of classical classification methods for multicollinear data. *Journal of Chemometrics* 12, 205-200.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, A. 2002. *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, UK.
- Nicolaï, B.M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K.I., Lammertyn, J. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology* 46, 99-118.

- Norris, K.H., Hart, J.R. 1965. Direct spectrophotometric determination of moisture content of grain and seeds. In: Proceedings of the 1963 International Symposium on Humidity and Moisture. Vol. 4. Reinhold Publication, New York, USA, pp. 19-25.
- Osborne, B.G., Fearn, T.A., Hindle, P. 1993. Introduction. In: Osborne, B.G., Fearn, T.A., Hindle, P. (Eds.), Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis. Longman Scientific and Technical, London, UK, pp. 1-12.
- Otto, M. 1999. Chemometrics. Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry. Wiley-VCH, New York, USA.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S. 2000. Introduction to Spectroscopy. 3<sup>rd</sup> Edition. Brooks/Cole Pub Co, Pacific Grove, CA, USA.
- Paz, P., Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A. 2008. Nondestructive determination of total soluble solid content and firmness in plums using Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2565-2570.
- Paz, P., Sánchez, MT., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A. 2009a. Instantaneous quantitative and qualitative assessment of pear quality using near infrared spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture* 69, 24-32.
- Paz, P., Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A. 2009b. Evaluating NIR instruments for quantitative and qualitative assessment of intact apple quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, 781-790.
- Penchev, P.N., Andreev, G.N., Varmuza, K. 1999. Automatic classification of infrared spectra using a set of improved expert-based features. *Analytical Chimica Acta* 388, 145-159.
- Pérez, P.M., Morales, J. 1998. Manual Básico de Laboratorio de Bodega. Dirección General de Investigación y Formación Agraria, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla, España.
- Pérez-Marín, D. 2005. Tecnología NIRS para la Certificación y Trazabilidad de Piensos Compuestos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, España.
- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E. 2006. Optimization of discriminant partial least squares regression models for the detection of animal by-product meals in compound feedingstuffs by near-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 60, 1432-1437.

- Pérez-Marín, D., Garrido-Varo, A., Guerrero, J.E. 2007. Non-linear regression methods in NIRS quantitative analysis. *Talanta*, 72, 28-42.
- Pérez-Marín, D., Sánchez, M.T., Paz, P., Soriano, M.A., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A. 2009. Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on-tree ripening and postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology* 52, 180-188.
- Pérez-Marín, D., Paz, P., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., Sánchez, M.T. 2010. Miniature handheld NIR sensor for the on-site non-destructive assessment of post-harvest quality and refrigerated storage behavior in plums. *Journal of Food Engineering* 99, 294-302.
- Pérez-Marín, D., Sánchez, M.T., Paz, P., González-Dugo, V., Soriano, M.A. 2011. Postharvest shelf-life discrimination of nectarines produced under different irrigation strategies using NIR-spectroscopy. *LWT-Food Science and Technology* 44, 1405-1414.
- Peynaud, E. 1996. *Enología Práctica*, 3ª Edición. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Rebelein, H. 1969. Dosage rapide de l'acide tartrique. *Office International de la Vigne et du Vin*, Feuillet Vert. 431.
- Rebelein, H. 1971. Correction de l'acidité des moûts et des vins. *Bulletin de l'OIV* 480, 136-141.
- Reynier, A. 2002. *Manual de Viticultura*. Mundi Prensa, Madrid, España.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. 1980. *Ciencias y Técnicas del Vino*. Tomo II. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Roberts, C.A., Workman, J., Reeves III, J.B. 2004. *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. ASA, CSSA and SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
- Ruiz, M. 2001. *Las Variedades de Vid y la Calidad de los Vinos*. AMV Ediciones & Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D. 2011. Nondestructive measurement of fruit quality by NIR spectroscopy. In: Vázquez, M., Ramírez, J.A. (Eds.), *Advances in Post-Harvest Treatments and Fruit Quality and Safety*. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, USA, pp. 101-163.
- Sánchez, M.T., Pérez-Marín, D., Flores-Rojas, K., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A. 2009. Use of near-infrared reflectance spectroscopy for shelf-life discrimination of green asparagus stored in a cool room under controlled atmosphere. *Talanta* 78, 530-536.

- 
- Sánchez, M.T., Flores-Rojas, K., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D. 2010. Measurement of pesticide residues in peppers by near-infrared reflectance spectroscopy. *Pest Management Science* 66, 580-586.
- Sánchez, M.T., De La Haba, M.J., Guerrero, J.E., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D. 2011. Testing of a Local approach for the prediction of quality parameters in intact nectarines using a portable NIRS instrument. *Postharvest Biology and Technology* 60, 130-135.
- Sánchez, M.T., De la Haba, M.J., Benítez-López, M., Fernández-Navales, J., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D. 2012. Non-destructive characterization and quality control of intact strawberries based on NIR spectral data. *Journal of Food Engineering* 110, 102-108.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1995a. *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph, NIRSystems, Inc., 12101 Tech Road, Silver Spring. MD 20904, USA.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1995b. *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*. NIRSystems, Silver Spring. MD 20904, USA.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1996. Calibration the ISI way. In: Davies, A.M.C., Williams, P. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp. 198-202.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O. 1998. U.S. Patent, 5798526, August 25, 1998.
- Shenk, J.S., Westerhaus, M.O., Berzaghi, P. 1997. Investigation of a LOCAL calibration procedure for near infrared instruments. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 5, 223-232.
- Shenk, J.S., Workman, J., Westerhaus, M. 2001. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. In: Burns, D.A., Ciurezac, E.W. (Eds.), *Handbook of Near Infrared Analysis*. 2<sup>nd</sup> Edition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 419-474.
- Siesler, H.W. 2002. Introduction. In: Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy*. Wiley-VCH Weinheim, Germany, pp. 1-10.
- Smyth, H.E. 2005. *The Compositional Basis of the Aroma of Riesling and Unwooded Chardonnay Wine*. PhD Thesis. University of Adelaide, Australia.



- Thyholt, K., Isaksson, T. 1997. Near infrared spectroscopy of dry extracts from high moisture food products on solid support-a review. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 5, 179-193.
- Vandeginste, B.G.M., Massart, D.L., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. 1998. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 649-699.
- Vigneau, E., Qannari, E.M., Devaux, M.F. 2000. Méthodes prédictives. In: Bertrand, D., Dufour, E. (Eds.), *La Spectroscopie Infrarouge et ses Applications Analytiques*. Technique & Documentation, Paris, France, pp. 295-332.
- Westerhaus, M.O., Workman, J., Reeves III, J.B., Mark, H. 2004. Quantitative analysis. In: Roberts, C.A., Workman, J., Reeves III, J.B. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. ASA, CSSA, SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 133-174.
- Weyer, L.G. 1995. Practical calibration strategies. In: Batten, G.D., Flinn, P.C., Welsh, L.A., Blakeney, A.B. (Eds.), *Leaping Ahead with Near Infrared Spectroscopy*. NIR Spectroscopy Group, Royal Australian Chemical Institute, Melbourne, Victoria, Australia, pp. 84-90.
- Williams, P.C. 1991. Application of near-infrared reflectance and transmittance spectroscopy in agriculture. In: Biston, R., Bartiaux-Thill, N. (Eds.), *The 3<sup>rd</sup> International Conference on Near Infrared Spectroscopy*. Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgium, pp. 463-473.
- Williams, P.C. 2001. Implementation of near-infrared technology. In: Williams, P.C., Norris, K.H. (Eds.), *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. AACC Inc., St. Paul, Minnesota, USA, pp. 145-169.
- Williams, P., Norris, K., 1987. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA.
- Williams, P.C., Norris, K. 2001. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*, 2<sup>nd</sup> Edition. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
- Williams, P.C., Sobering, D. 1992. Objective prediction of functionality by near infrared technology. In: Murray, I., Cowe, I. (Eds.), *Making Light Work: Advances in Near Infrared Spectroscopy*. VCH, Weinheim, Germany, pp. 217-222.

- 
- Williams, P.C., Sobering, D. 1996. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In: Davies, A.M.C., Williams, P.C. (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves*. NIR Publications, Chichester, West Sussex, UK, pp. 185-188.
- Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M. 2006. *PLS Toolbox Version 4 for Use with MATLAB*. Eigenvector Research, Wenatchee, USA.
- Woo, Y., Kim, H., Chung, H. 1999. Classification of cultivation area of ginseng radix with NIR and Raman spectroscopy. *The Analyst* 124, 1223-1226.
- Woodcock, T., Downey, G., O'Donnell, C.P. 2008. Better quality food and beverages: the role of near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 16, 1-29.
- Workman, J.Jr. 1992. NIR spectroscopy calibration basics. In: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near Infrared Analysis. Practical Spectroscopy Series, Volume 13*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp.247-280.
- Workman, J.Jr., Burns, D.A. 2001 Commercial NIR instrumentation. In: Burns, D., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near Infrared Analysis. 2<sup>nd</sup> Edition*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA, pp. 53-70.
- Workman, J.Jr., Shenk, J. 2004. Understanding and using the near-infrared spectrum as an analytical method. In: Roberts C.A., Workman, J., Reeves III, J.B. (Eds.), *Near-Infrared Spectroscopy in Agriculture*. ASA, CSSA, SSSA, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 3-10.
- Wu, D., He, Y., Nie, P., Cao, F., Bao, Y. 2010. Hybrid variable selection in visible and near-infrared spectral analysis for non-invasive quality determination of grape juice. *Analytica Chimica Acta* 659, 229-237.
- Zamora, F. 2003. *Elaboración y Crianza del Vino Tinto: aspectos científicos y prácticos*. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Zhang, L., Xue, L., Liu, M.H., Li, J. 2011. Nondestructive detection of soluble solids content of nanfeng mandarin orange using VIS-NIR spectroscopy. In: Xu, Q., Ge, H., Zhang, J. (Eds.), *Advanced Materials Research* 361-363, 1634-1637.