



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE VINOS TINTOS DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE ARAGÓN EN SU MACERACIÓN CON FRAGMENTOS DE ROBLE Y CRIANZA EN BARRICA

**Study of the behaviour of red wines of native
varieties in their maceration with oak fragments
and aging in barrel**

Autora: Mónica Rami Rodríguez

Directora: Ana Escudero Carra

Universidad de Zaragoza

Departamento de Química Analítica

Grado en Química

Julio 2018

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE) de la Universidad de Zaragoza por haberme facilitado los datos con los que se ha podido realizar este trabajo.

A mi directora, Ana Escudero, por todo lo que me ha enseñado, su atención y su ayuda durante todo el año.

A mis padres por su confianza en mí y haber hecho posible que llegue a ser Química, y en especial a mi hermano Jorge por compartir su alegría conmigo.

Por último agradecer a todos mis amigos a los que les he hablado con ilusión de este trabajo y me han apoyado en todo momento.

RESUMEN

El vino es una de las matrices químicas más complejas que existen, ya que contiene gran variedad de compuestos diferentes. En este trabajo se han estudiado 259 muestras distintas de vino, definidas por su variedad, añada, tiempo y tipo de conservación. De cada muestra se disponía de la concentración de 70 compuestos responsables del aroma del vino. Se ha utilizado la quimiometría para, mediante diferentes tests estadísticos y análisis de varianza, conocer cuáles son las variables que más influyen en el nivel de los diferentes compuestos del aroma. Se ha trabajado de forma especial con los datos de una añada, y en concreto de hexanoato de etilo, isobutirato de etilo y 4-etilfenol. La concentración del último solo varía de forma significativa dependiendo de la variedad (siendo más alta en los vinos procedentes de la variedad Vidadillo). La concentración de los dos ésteres etílicos estudiados varía significativamente con los 3 factores estudiados, e incluso son significativas las interacciones entre factores; con la excepción del hexanoato que no varía con el tipo de conservación, ni es significativa la interacción tipo x tiempo de conservación.

ABSTRACT

Wine is one of the most complex chemical matrix that exists, since it contains a great variety of different compounds. In this work, 259 different samples of wine have been studied, defined by their variety, vintage, time and type of conservation. The concentration of 70 compounds responsible for the wine's aroma is available from each sample. Chemometry has been used to know, through different statistical tests and analysis of variance, the variables that most influence the level of different aroma compounds. We have worked in a special way with the data of a vintage, and in particular of ethyl hexanoate, ethyl isobutyrate and 4-ethylphenol. The concentration of the latter only varies significantly depending on the variety (being higher in wines from the Vidadillo variety). The concentration of the two ethyl esters studied varies significantly with the 3 factors studied and even the interactions between factors are significant; with the exception of hexanoate, which does not vary with the type of conservation, nor is the interaction between type x time of conservation significant.

INDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 La importancia del aroma del vino	1
1.2 Importancia de la añada, variedad y tipo de conservación en el vino	2
1.3 Importancia del tratamiento estadístico para obtener conclusiones	4
2.OBJETIVOS	4
2.1 General.....	4
2.2 Específico.....	4
3.MÉTODOS	4
3.1 Obtención de datos	4
3.1.1 Compuestos mayoritarios	5
3.1.2 Compuestos minoritarios	5
3.2 Tratamiento de datos	6
3.2.1 Herramientas estadísticas utilizadas.....	6
4.PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO Y RESULTADOS	8
4.1 Construcción de la matriz	8
4.2 Pre-tratamiento	8
4.3 Análisis de Varianza.....	13
5.CONCLUSIONES	24
5.1 General.....	24
5.2 Específico.....	24
6.BIBLIOGRAFIA	25
7.ANEXOS	26

1.INTRODUCCIÓN

1.1 LA IMPORTANCIA DEL AROMA EN EL VINO

El vino es una disolución hidroalcohólica con un contenido de etanol alrededor del 13% v/v.

En este medio se encuentran disueltas una gran variedad de sustancias, como azúcares, alcoholes, ácidos, compuestos fenólicos, sales minerales, sustancias nitrogenadas y material macromolecular. Se trata de una de las bebidas más complejas que existen, debido en gran medida a su aroma, ya que tiene una gran riqueza de notas.

Actualmente se sigue estudiando cómo los volátiles del vino interactúan entre ellos, con la matriz y con nosotros mismos para dar lugar a la sensación organoléptica.

El conocimiento del aroma del vino se consigue a través de datos cuantitativos de concentraciones, umbrales de olfacción y análisis sensorial.

Una clasificación posible de los componentes del aroma del vino es la siguiente¹:

-Compuestos impacto, son compuestos que transmiten al vino su aroma específico y dan matices sin necesidad de otros compuestos soporte. Ejemplos de estos compuestos son el linalool, (E)-whiskylactona, metionol o diacetilo. También puede ser que el efecto sensorial impacto lo provoque la unión de varios compuestos pertenecientes a la misma familia química. Estas familias de compuestos suelen tener estructuras químicas similares, un ejemplo son las γ -lactonas².

-Compuestos sutiles, son compuestos importantes en el aroma del vino, pero necesitan de otros compuestos químicos soporte con notas similares.

-Compuestos que forman la base aromática del vino, son compuestos presentes en todos los vinos. Su aroma está plenamente integrado en la matriz aromática del vino. Son los responsables del aroma vinoso. Son, sobretodo, ésteres, ácidos y alcoholes de fermentación.

-Off-flavours, son compuestos cuya presencia hace que baje la calidad del vino. Un ejemplo son el 4-etilfenol y el 4-vinilguaicol, generados por levaduras *Brettanomyces* a partir de los ácidos hidroxicinámicos. Otro ejemplo son los compuestos relacionados con el corcho como el 2,4,6-tricloroanisol (TCA).

Otro tipo de clasificación de los compuestos del aroma es según su familia química.³La matriz del vino la forman diferentes familias de compuestos, de las cuales destacamos:

-Alcoholes de fusel, son parte del cuerpo común de todos los vinos. Son el 2-metilbutanol, 3-metilbutanol, isobutanol y 2-feniletanol. Todos tienen olores poco agradables, menos el 2-feniletanol que tiene notas de rosas.

-Ésteres de fermentación, son los ésteres etílicos de los ácidos grasos y los acetatos de los alcoholes superiores. Sus olores coinciden con los descriptores frutales de los vinos, aunque su sola presencia no es capaz de explicar todas estas notas. La cantidad de estos compuestos está relacionada con la calidad del vino blanco y rosado. Cabe destacar que esta correlación solo se mantiene si el acetato de etilo está por debajo de los 80mg/L, ya que por encima tiene un efecto supresor en el resto de los ésteres⁴.

-Alcoholes terpénicos, son los responsables de los aromas de los vinos hechos con uvas de variedad Moscatel. No sufren grandes variaciones durante la fermentación. Los más habituales son linalool, geraniol, β -citronelol y nerol.

-Ácidos, son contribuyentes netos al cuerpo común del aroma del vino. Se destaca el ácido acético, ácido isovaleriánico, butírico e isobutírico.

-Acetaldehído, es un compuesto impacto, se trata del aldehído mayoritario. Es desactivado (no huele) por su combinación con sulfuroso. Su olor recuerda a frutas verdes.

-Aldehidos fenólicos, principalmente el siringaldehído y la vanillina. La presencia de vanillina es importante en la apreciación del aroma de los vinos envejecidos en madera.

- α -Dicetonas, destaca la 2,3-butanodiona (diacetilo) por su olor pesado y graso que recuerda a la mantequilla.

-Fenoles volátiles, el fenol y los cresoles se encuentran en cantidades muy inferiores a sus umbrales de olfacción de manera que no tiene ninguna significación sensorial. El guaiacol, refuerza notas como medicinal o ahumado. Los etilfenoles como el 4-etilfenol o 4-etilguaiacol son importantes en vinos tintos envejecidos o almacenados en barricas porque pueden alcanzar niveles que superan sus umbrales de olfacción. Sus notas se relacionan con olores desagradables de animal, cuero o establo. Los vinilfenoles, principalmente 4-vinilfenol y 4-vinilguaiacol disminuyen la calidad del vino por enmascaramiento de las notas frutales. El eugenol, cuando supera su umbral de olfacción mejora la calidad del vino con notas que recuerdan al clavo.

-Lactonas, las γ -lactonas, cuyo compuesto más importantes es la γ -butirolactona, son más comunes que las δ -lactonas. Las γ y δ -nonalactonas y las γ y δ -decalactonas poseen un intenso aroma a melocotón o coco. La 4-metil- γ -octalactona o whiskylactona, está presente cuando se envejece con roble. La nota aromática es coco, aunque a bajas concentraciones el isómero cis se relaciona con la nota a vainilla en vinos tintos.

-Norisoprenoides, productos de la degradación de los carotenoides. Los aromas más potentes son los de la β -damascenona que tiene propiedades aromáticas altamente deseables como son las notas a ciruela pasa y florales, y las α y β -iononas, esta última importante en los vinos Moscatel.

1.2 IMPORTANCIA DE LA AÑADA, VARIEDAD Y TIEMPO Y TIPO DE CONSERVACIÓN EN EL VINO

La concentración de los diferentes tipos de compuestos que forman el aroma del vino depende de los factores que definen cada muestra. Estos factores, en este trabajo son la variedad, la añada y el tiempo y tipo de conservación.

Según la variedad de uva, el vino tendrá diferentes concentraciones de compuestos aromáticos.

Los distintos tipos de **variedades** estudiadas son las siguientes:

Vidadillo, está definida por ser una variedad rústica y vigorosa con moderado o bajo contenido en azúcar.

Mazuela, variedad que prefiere climas cálidos y secos. Esta uva presenta alta carga de taninos, acidez y coloración, cuando tiene un grado alcohólico alto.

Garnacha, es una variedad muy sensible a la oxidación, sus vinos envejecen muy rápidamente. Da vinos de mucho grado, afrutados (referencias), aunque de poco color en el caso de elevados rendimientos^{5,6}.

Derechero, los vinos que se obtienen de este tipo de vid son de graduación media, cuerpo intenso y alto nivel de tanicidad, de lo que resulta un postgusto largo e intenso. Es una planta fuerte que se adapta a las condiciones adversas de sequía o humedad.

Según la **añada** en la que se haya hecho la vendimia, la uva estará en peores o mejores condiciones relacionadas con el ambiente climatológico que la haya rodeado. Las horas de sol, cantidad de precipitación, variaciones de temperatura entre el día y la noche, marcan completamente las características composicionales y sanitarias de la materia prima, por lo que influye en gran medida en la calidad en general y calidad aromática en particular del vino obtenido.

El **tiempo y tipo de conservación** son factores que también influyen en las concentraciones de los compuestos aromáticos.

Se han estudiado 4 tiempos de conservación: 3, 6, 9 y 12 meses.

Muchos compuestos están relacionados con el envejecimiento del vino. Este puede ser al abrigo del oxígeno (en botella) o en contacto con el oxígeno (en bodega). En cualquiera de los dos tipos se van produciendo reacciones de hidrólisis, esterificación, formación de aductos, oxidaciones, reducciones, polimerizaciones que van modificando el perfil aromático de los vinos con el tiempo.

El último factor estudiado es el tipo de conservación. Este factor es importante tenerlo en cuenta ya que se asocian algunos compuestos con la madera.

La lignina de la madera se degrada durante el tostado dando lugar a fenoles volátiles y aldehídos aromáticos (guaiacol, vainillina, siringaldehído). Normalmente la madera usada en el envejecimiento está tostada, y cede al vino estos compuestos. Las maderas sin tostar son aromáticamente menos intensas⁷.

Se estudiaron 4 tipos de conservación: en bodega y en tanques con fragmentos de roble (chips) de tostado ligero, medio o alto. Estas últimas muestras estuvieron 45 días en depósito con los fragmentos de roble y posteriormente se embotellaron para la conservación.

El esquema del experimento de donde se han sacado los datos químicos es el siguiente:

AÑADA 2008

Garnacha → Barrica: 3, 6, 9 y 12 meses

→ Chips tostado bajo, medio y alto: 3, 6, 9 y 12 meses.

Para las variedades Vidadillo y Mazuela se sigue el mismo procedimiento.

Las muestras procedentes de bodega son por duplicado (2 bodegas diferentes). El resto son por triplicado (3 botellas diferentes).

AÑADA 2009

Lo mismo que en el añada 2008 pero con las variedades Garnacha, Mazuela, Vidadillo y Derechero.

En esta añada todas las muestras están por duplicado (2 barricas diferentes y 2 botellas diferentes).

AÑADA 2010

El experimento es exactamente igual al 2009, pero sólo con la variedad Derechero.

1.3 IMPORTANCIA DEL TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA OBTENER CONCLUSIONES

La *quimiometría* es la disciplina química que se enfoca en la aplicación de métodos matemáticos o estadísticos sobre datos químicos para sacar resultados y conclusiones⁸.

Abarca un amplio campo de diferentes métodos que pueden ser aplicados en química, como el análisis de varianza (ANOVA). En este trabajo se ha aplicado la quimiometría a concentraciones de compuestos del aroma de cientos de vinos tintos para poder resaltar si el compuesto X está ligado a alguno de los factores estudiados. El anova es una herramienta estadística muy poderosa ya que permite comparar toda una serie de datos, y no parejas, como hacen los tests estadísticos convencionales. El anova es capaz de separar fuentes de incertidumbre que intervienen en la incertidumbre del resultado final.

Cada muestra estudiada está definida por una serie de factores (variedad, añada, tipo y tiempo de conservación). Además, conocemos la concentración de 70 compuestos químicos responsables del aroma de las muestras. Tras aplicar la quimiometría, podremos relacionar los factores que definen cada muestra con los compuestos químicos que hay en cada vino.

2.OBJETIVOS

2.1 GENERAL: Aplicar la quimiometría aprendida en el grado de Química a datos reales obtenidos en experimentos amplios con muestras de vino.

2.2 ESPECÍFICO: Conocer cuáles son los compuestos del aroma, cuyo nivel está influenciado por los diferentes factores estudiados (variedad de uva de la que procede el vino, tiempo de almacenamiento o tipo de conservación).

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE DATOS

Para poder abordar este trabajo, se han necesitado los datos a los que aplicar herramientas quimiométricas.

Dichos datos son concentraciones de compuestos aromáticos obtenidos a partir de análisis de compuestos mayoritarios y minoritarios de las muestras de vino estudiadas.

3.1.1 COMPUESTOS MAYORITARIOS:

Se analizaron mediante cromatografía de gas usando un detector de ionización en llama⁹.

En tubos de centrifuga se añaden 4,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 mL de vino, 7 mL de agua, 15 μL de estándar interno (4-metil-2-pentanol, 2-octanol, ácido heptanoico y heptanoato de etilo a 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol) y 0,25 mL de diclorometano.

Se agita durante 1 hora y se centrifuga 10 minutos a 2500 rpm. Tras la separación de fases, se recupera la fase orgánica, transfiriendo unos 100 microlitros con una jeringa a un vial.

Posteriormente se inyecta un microlitro del extracto en el cromatógrafo.

El cromatógrafo que se usó fue Hewlett-Packard 5890 Series II.

Parámetros del cromatógrafo:

Columna: 50 m X 0,32 mm, DBWax con 0,5 μm de espesor de fase.

Programa de temperaturas: 40°C durante 5 minutos, después se elevó a 3°C/minuto hasta 200°C.

Gas portador: H_2 a 3 mL/minuto

Inyección: 3 μL en modo Split.

Flujo Split: 30 mL/min.

Detector: FID

Los datos cuantitativos se obtienen de aplicar el factor de respuesta de cada compuesto a las áreas relativas al estándar interno correspondiente.

Los compuestos estudiados mediante este método se muestran en la tabla 18.

3.1.2 COMPUESTOS MINORITARIOS:

Se analizaron mediante extracción en fase sólida (SPE) y posterior cromatografía de gas con detección de espectrometría de masas¹⁰.

Para compuestos que están en concentraciones extremadamente bajas (0,1–100 $\mu\text{g}/\text{L}$) se debe realizar en el procedimiento de análisis una etapa de pre-concentración.

Esta pre-concentración se consigue gracias a la extracción en fase sólida (SPE) usando un sorbente polimérico que tenga afinidad por los analitos que queremos pre-concentrar.

Las etapas de la extracción en fase sólida son las siguientes:

- Acondicionamiento de las resinas del interior del cartucho, pasando diclorometano.
- Carga de los analitos, pasando a través del cartucho 50 mL de vino a los que se les ha añadido estándar interno (4-hidroxi-4-metil-2-pentanona y 2-octanol, ambos en 300 μg por g de diclorometano).
- Los analitos se retienen en la resina polimérica, mientras el resto de componentes del vino pasan a través del cartucho.
- Lavado del cartucho con agua, para retirar del mismo todo lo que no sean los analitos adsorbidos en las resinas
- Elución con un disolvente afín a los analitos, en este caso 0,5 mL diclorometano.

El extracto de diclorometano se analiza mediante GC-MS.

Se usó el cromatógrafo Star 3400CX instalado con el espectrómetro de masas de trampa de iones Saturn 4 de Varian.

Parámetros del cromatógrafo:

Columna: 60 m X 0,25 mm DBWAX con un espesor de fase de 0,5µm.

Programa de temperaturas: 40°C durante 5 minutos, después se elevó a 2°C/minuto hasta 230°C.

Gas portador: He a 1mL/minuto

Inyección: 3µL en modo Split.

Para saber la concentración de cada compuesto se utilizan las áreas relativas al estándar interno correspondiente y el factor de respuesta de cada compuesto calculado con disoluciones de concentración conocida.

Los compuestos estudiados mediante este método se muestran en la tabla 18.

3.2 TRATAMIENTO DE DATOS

Las diferentes herramientas estadísticas que se han usado en este Trabajo Fin de Grado aparecen descritas a continuación.

-DIAGRAMA EN CAJAS, utilizado en el pre-tratamiento de datos, nos da una idea general de la matriz estudiada, en ellos se puede observar la media, mediana, cuartiles y posibles anómalos de cada compuesto.

-TEST DE DIXON, que sirve para la determinación de datos anómalos, basándose en la siguiente expresión:

$$Q_{\text{experimental}} = \frac{\text{Dato anómalo} - \text{dato más cercano}}{\text{máximo} - \text{mínimo}}$$

Este dato se compara con la Q teórica, para una probabilidad elegida y el número de datos estudiado. Si $Q_{\text{exp}} > Q_{\text{teor}}$ el dato puede considerarse anómalo.

-ANOVA

El anova es una herramienta estadística que permite separar y estimar las distintas fuentes de variación que actúan sobre un conjunto de datos y determinar cuáles de ellas ejercen un efecto suficiente como para influenciar el conjunto de datos por encima del error aleatorio o experimental.

Las fuentes de variación son los factores de los que depende la población estudiada (en este caso concentraciones de compuestos aromáticos), que pueden causar diferencia en los datos tratados. Permite saber si hay variabilidad en el resultado de una medida cuando se cambian los factores explicativos de esa medida.

Para que se pueda realizar un ANOVA, las mediciones deben ser independientes.

Para realizar un ANOVA primero deberemos saber, si al cambiar los factores que queremos estudiar se observa cambio en el resultado, es decir, si ese factor es significativo en nuestros resultados. Esto se consigue aplicando el test F. Por último, se procede al cálculo de la mínima diferencia significativa, la cual nos dice el valor a partir del cuál empieza a haber cambio en los resultados.

Los pasos a seguir en la aplicación de un anova son los siguientes:

1) Elección de la hipótesis nula: Todas las variaciones que aparecen en la tabla de resultados se deben sólo a errores aleatorios (los diferentes factores ejercen una influencia NULA sobre la concentración de los compuestos aromáticos).

2) Con base a esta hipótesis se calcula la varianza:

a) Estudiando la variación dentro de los grupos, por ejemplo compuesto 1 en la variedad A.

b) Estudiando la variación entre grupos, por ejemplo el compuesto 1 entre las diferentes variedades.

3) El análisis de varianza determinará si estas difieren significativamente por medio del test F.

TEST DE FISHER APLICADO A LA COMPARACIÓN DE VARIANZA ENTRE GRUPOS Y VARIANZA DENTRO DE LOS GRUPOS

1) Estimación de la varianza dentro de los grupos (promedio de las varianzas)

Cálculo de la varianza para cada conjunto de medidas repetidas, por ejemplo compuesto 1 en todos los vinos de la variedad A.

Cálculo de la media ponderada de todas esas varianzas (las del compuesto 1 en la variedad A, B, C y D), que es la mejor estimación de variabilidad analítica.

2) Cálculo de la varianza entre grupos (varianza de los promedios)

Determinación de la varianza de las medias del compuesto 1 para cada variedad por ejemplo, necesario para calcular la varianza del factor.

Las medias de cada grupo (variedad en este ejemplo) serán distintas ya que se cambia la variable (factor variedad) y por la incertidumbre asociada que lleva la medida.

3) Comparación de ambas varianzas

$$F_{\text{EXPERIMENTAL}} = \frac{\text{VARIANZA DE LOS PROMEDIOS} \cdot \text{NÚMERO DE MEDIDAS}}{\text{PROMEDIO DE LAS VARIANZAS}}$$

Si el valor experimental de F supera al valor crítico de F, calculado en tablas estadísticas con 95% de confianza y (n-1) grados de libertad, siendo n el número de medidas, se rechaza la hipótesis nula, que decía que la varianza entre grupos no era significativamente distinta. Esto significa que la varianza entre grupos es significativamente mayor que dentro de los grupos y eso quiere decir que la variable cambiada (en este ejemplo, la variedad) afecta significativamente a la concentración del compuesto 1. La hipótesis NULA no es cierta, la variación entre los datos no solo es aleatoria, depende de la variable estudiada.

CÁLCULO DE LA MÍNIMA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA (LSD)

Una vez que se haya demostrado que existe una influencia significativa del factor sobre el resultado, se puede calcular la mínima diferencia significativa para saber a partir de qué valor el cambio es significativo.

Se hace mediante la siguiente expresión: $LSD = SED \cdot t_{residual}$ (Least significant difference) = SED (standard error of differences) * $t_{residual}$

Siendo $SED = \sqrt{\frac{2}{n}} * \sqrt{\text{promedio de las varianzas}}$ y $t_{residual}$ es el t encontrado en tablas con los grados de libertad dentro de los grupos. Estos grados de libertad se calculan restando a los grados de libertad totales $[(n \cdot h) - 1]$ (siendo n las muestras analizadas y h los subfactores estudiados) los grados de libertad entre grupos $(h - 1)$ siendo h los subfactores estudiados. Por ejemplo cuando trabajemos con el factor variedad, tenemos 32 muestras analizadas de 4 variedades diferentes, entonces los grados de libertad serían, $[(32 \cdot 4) - 1] - [4 - 1] = 124$.

Se compara LSD con las diferencias de los valores medios, en este caso, de cada variedad.

El software usado para la realización de los estudios estadísticos fue Excel versión 2013 con la extensión XLSTAT.

4. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO Y RESULTADOS

4.1 CONSTRUCCIÓN DE LA MATRIZ DE DATOS COMPLETA

En primer lugar se construye una matriz donde estén reflejados todos los datos: las primeras columnas indican los factores, las siguientes los datos de cada uno de los compuestos y en cada fila hay una muestra de vino. Esto se hace de la siguiente manera:

A partir de los distintos archivos en Excel, proporcionados por el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología de la Universidad de Zaragoza, donde se pueden encontrar todos los resultados de todas las muestras, se construye una tabla que contenga todas las muestras ordenadas y perfectamente identificadas. Esto quiere decir que, cada muestra tenga sus variables (añada, tiempo de conservación, variedad de uva de procedencia y tipo de madera y tostado utilizado en la conservación del vino) y la concentración de cada compuesto bien definida.

Este estudio fue muy amplio ya que se trabajó para la construcción de una matriz con 18130 datos, 259 muestras con 70 compuestos analizados en cada una.

4.2 PRE-TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Una vez ordenada la matriz completa de todas las muestras de vino, necesitamos tener una visión general de los datos antes de empezar a hacer tests de significación y análisis más completos. Tener una visión general de los datos sirve para intuir posibles anomalías pero nunca para descartar datos ni compuestos.

Realizamos un tratamiento previo de los datos mediante la utilización de diagramas de cajas. Los diagramas de cajas nos proporcionaron una visión de la distribución de nuestros datos. Para cada compuesto, proporcionan la media, mediana, el máximo, el mínimo, el primer y tercer cuartil, la varianza y la desviación estándar de todo el conjunto de datos para ese compuesto. La construcción del diagrama de caja se basa en el cálculo de cuartiles. En primer lugar se ordenan los datos, después se calculan los cuartiles, y posteriormente los bigotes. Q1 es el primer cuartil, el dato por debajo del cual están el 25% de los datos, la mediana o segundo cuartil es el dato por debajo del cual se encuentran el 50% de los datos y el Q3 o tercer cuartil es el dato por debajo del cual se encuentran el 75% de los datos.

El rango inter-cuartílico se calcula como $Q3-Q1$, allí se encuentran el 50% de los datos. Las líneas que se extienden de la caja se llaman bigotes y muestran el máximo y el mínimo que tendrían que tener los datos según las ecuaciones indicadas abajo. Los datos que superen estos bigotes se considerarán anómalos.

Para calcular el mínimo y máximo marcado por los bigotes, se utiliza la siguiente expresión:
Mínimo= $Q1-1,5*\text{rango intercuartílico}$. Si el dato es <0 , se considera 0. Si el dato calculado es inferior al mínimo de los datos, se considera este último.
Máximo= $Q3+1,5*\text{rango intercuartílico}$. Si el dato calculado es superior al máximo de los datos, se considera este último.

Como ejemplo ilustro diferentes diagramas de cajas y los datos calculados para estos compuestos:

Acetaldehído: los parámetros del diagrama de cajas aparecen en la tabla 1. Puede verse que la media es superior a la mediana, por existir muchos ceros. El número de posibles anómalos es 10, como puede verse en la figura 1.

Número de observaciones	259
Mínimo de los datos	0,00
Máximo de los datos	19,84
Mínimo de los bigotes	-4,76 → 0
Máximo de los bigotes	12,52
Q3-Q1	4,32
1º Cuartil	1,72
Mediana	3,14
3º Cuartil	6,04
Media	4,57
Varianza	18,30
Desviación estándar	4,28
Desviación estándar relativa	93,56

Tabla1. Parámetros del diagrama de cajas para el acetaldehído

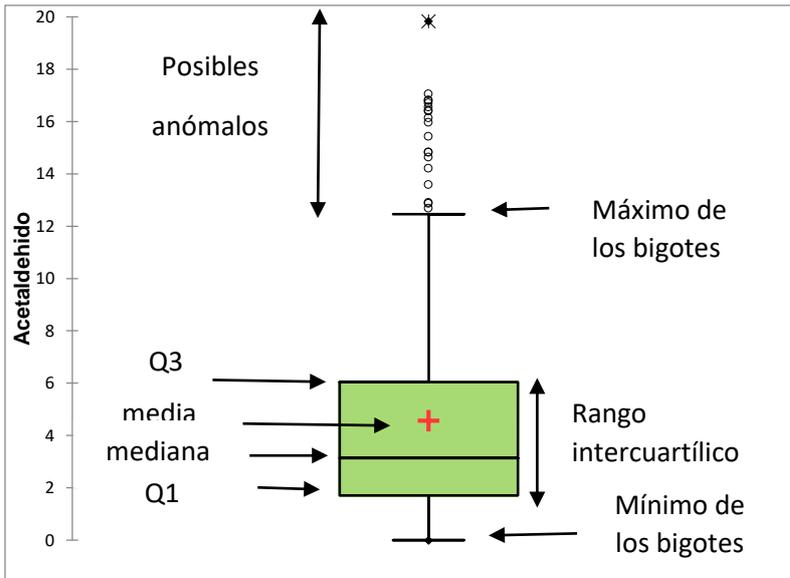


Figura 1. Diagrama de cajas para los datos del acetaldehído

Acetato de etilo: en este compuesto no se observaron anómalos, como puede observarse en la tabla y figura 2.

Número de observaciones	259
Mínimo de los datos	15,39
Maximo de los datos	115,72
Mínimo de los bigotes	7,07 → 15,39
Máximo de los bigotes	119,23 → 115,72
Q3-Q1	28,04
1º Quartil	49,13
Mediana	66,70
3º Quartil	77,17
Media	62,79
Varianza	400,41
Desviación estándar	20,01
Desviación estándar relativa	31,87

Tabla 2. Parámetros del diagrama de cajas para el acetato de etilo.

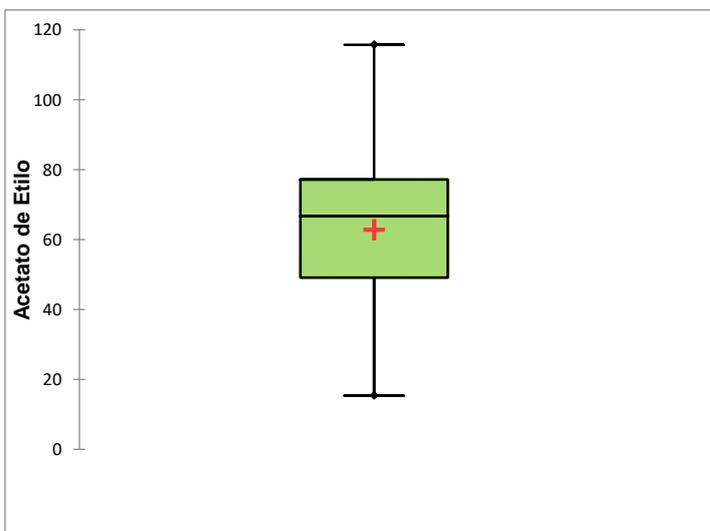


Figura 2. Diagrama de cajas para los datos del acetato de etilo

4-etilfenol: hay mucha dispersión de datos, el 75% son inferiores a 11,64 ppb, sin embargo la media de los 259 datos es de 28,34 ppb, ya que hay bastantes valores posibles anómalos, por encima del máximo de los bigotes (27,45ppb) (ver tabla y figura 3).

Número de observaciones	259
Minimo de los datos	0,00
Maximo de los datos	432,57
Mínimo de los bigotes	-14,71 → 0
Máximo de los bigotes	27,45
Q3-Q1	10,54
1º Quartil	1,10
Mediana	1,70
3º Quartil	11,64
Media	28,34
Varianza	3720,06
Desviación estándar	60,99
Desviación estándar relativa	215,20

Tabla 3. Parámetros del diagrama de cajas para el 4-etilfenol.

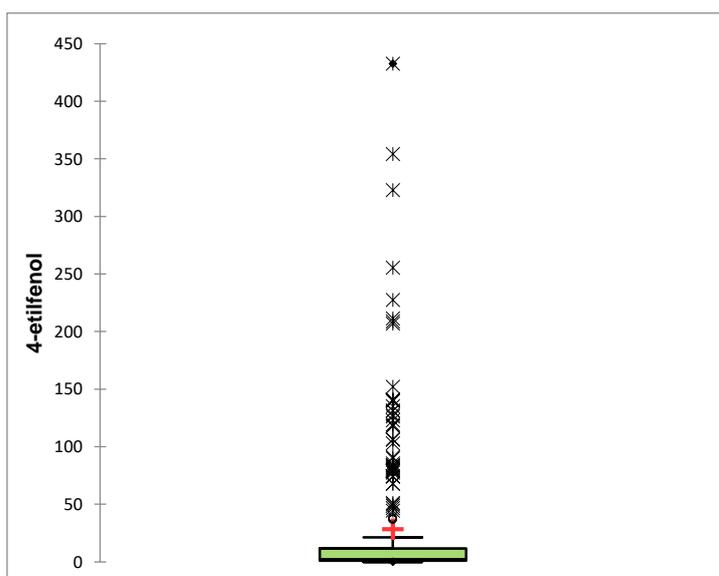


Figura 3. Diagrama de cajas para los datos del 4-etilfenol.

Teniendo la desviación típica y la varianza, se calcula la desviación estándar relativa para observar en qué compuestos hay más variabilidad. De los 3 compuestos mostrados, se observa que el 4-etilfenil es el de mayor variabilidad.

Se observan todos los diagramas de caja compuesto a compuesto para asegurarnos de que la matriz es correcta y/o poder eliminar datos que no concuerden.

Se ha de resaltar que, aunque en el diagrama de cajas, algunos resultados los marque como atípicos pueden no serlo. Para saber si son o no atípicos se comparan los datos marcados como atípicos en cada compuesto con los rangos de concentración que pueden alcanzar realmente los

componentes volátiles¹¹. Si vemos que esos resultados están dentro del intervalo de concentración del compuesto, el dato no se descartará.

Los motivos de que se marquen como posibles atípicos pueden ser diversos:

-Error de análisis

-Compuestos que se forman en mayor o menor concentración en unas determinadas circunstancias (levaduras *Brettanomyces* en la barrica, un determinado factor : año, variedad...)¹².

Al comparar los valores atípicos de cada compuesto con los rangos de concentración esperados en cada uno de ellos, se observan ciertos compuestos que llaman la atención. Estos son algunos ejemplos:

-Benzaldehido: Observamos un dato extraño, 23,42ppb, correspondiente a la muestra 24 (Mazuela/2008/3M/TA).

- β -citronelol: Alto en Derechero.

-Geraniol: Valores altos en Derechero, puede tratarse de una variedad terpénica.

-Dihidrocinnamato de etilo: Aumenta la concentración con el envejecimiento.

-E-whiskylactona: Anómalo 38,06ppb correspondiente a la muestra 204 (Derechero/2009/12M/TL)

-O-cresol: Anómalo 10,17 ppb, correspondiente a la muestra 257 (Derechero/2010/9M/TL)

-Cinnamato de etilo: Parece unido al Vidadillo.

-4-Etilfenol; contaminación por *Brettanomyces*, parece haber más en Derechero.

-4-Vinilfenol: Este compuesto lo vamos a quitar porque no cuadra con el 4-etilfenol, ni con variedad ni añada, se debió analizar mal.

El 4-vinilfenol es un compuesto que se forma a partir de los ácidos hidrocinnámicos por las levaduras *Brettanomyces*. Posteriormente lo transforman en el 4-etilfenol. Estos dos compuestos tendrían que estar relacionados. A su vez el 4-etilfenol debe estar relacionado con el 4-etilguaiacol, por tener el mismo origen. Al observar estas relaciones concluimos que los datos del 4-vinilfenol son anómalos.

Con estas conclusiones y a la vista de los resultados, vamos a modificar la matriz de datos que teníamos incluyendo las siguientes modificaciones:

1) Eliminación de los compuestos, acetato de hexilo, α -ionona y δ -octalactona, debido a que la concentración era casi siempre por debajo del límite de detección.

2) Eliminación del compuesto 4-vinilfenol.

3) Eliminación de los datos 23,42ppb (Benzaldehido, Mazuela/2008/3M/TA) 10,17ppb (O-cresol, Derechero, 2010, 9M, TL) 38,06ppb (E-whiskylactona/Derechero/2009/12M/TL) tras aplicar el test de Dixon.

Los datos marcados como posibles anómalos y que no están dentro de los rangos de bibliografía, los analizamos mediante el test de Dixon que sirve para eliminar o no posibles datos sospechosos.

Como ejemplo voy a explicar la eliminación del dato 10,17 ppb correspondiente al o-cresol.

Primero se formulan dos hipótesis, la hipótesis nula que dice que el valor no es anómalo y la hipótesis alternativa que sí que considera el valor sospechoso como anómalo.

Al aplicar el test, calculo la Q experimental y la comparo con la Q crítica, si $Q_{exp} > Q_{crit}$, se rechaza la hipótesis nula y el valor sospechoso se elimina. En este caso,

$$Q_{experimental} = \frac{10,17 - 5,28}{10,17 - 0,55} = 0,5083.$$

La $Q_{crítica}$ de las tablas, con probabilidad $p=0,05$ y $n=100$ es 0,1846. Este es el valor encontrado con la n más alta.

Como $Q_{experimental} > Q_{crítica}$, se rechaza el valor de 10,17ppb. Se considera anómalo.

Se hizo este mismo test para todos los datos que parecieron anómalos, y tras la comprobación se eliminaron los 3 citados anteriormente.

4.3 ANÁLISIS DE VARIANZA

Una vez acabado el pre-tratamiento se procede a hacer el análisis de mayor importancia, análisis de varianza, ANOVA.

Para poder realizar el anova lo primero que hacemos es coger solo los datos de la añada del 2009. Esto es así, ya que si no, no tendríamos un conjunto de datos completo, ya que en la añada de 2008 no se analizó Derechero y en la añada del 2010 solo se analizaron muestras de la variedad Derechero.

Hay diferentes tipos de variabilidad asociadas a nuestros compuestos:

-Variabilidad analítica o error aleatorio que es la diferencia que hay cuando a una misma muestra se le hacen medidas varias veces. En nuestro experimento del 2009 no hubo réplicas analíticas, los duplicados consisten en 2 barricas o dos botellas, por lo que la variabilidad además de ser analítica incluye las diferencias entre barricas o entre botellas-corcho.

-Variabilidad debida a los factores que definen las muestras, que es la que nos interesa en el anova.

En nuestro caso, como solo vamos a trabajar con muestras de la añada del 2009, tenemos 3 posibles fuentes de variabilidad (además de la analítica), la primera es el factor variedad, la segunda es el tiempo de conservación y la tercera es el tipo de conservación (barrica o chips con diferentes tostados).

Estas tres fuentes de variación son las que vamos a estudiar para ver si afectan a la concentración de los compuestos del aroma del vino.

Comenzamos haciendo de forma manual análisis de varianza de un factor. Inicialmente el análisis de la varianza para el factor variedad para el compuesto isobutirato de etilo, olvidándonos del resto de compuestos y del resto de factores.

Para calcular la variabilidad de un compuesto debida a la variedad, se calculan para ese compuesto la media de los datos obtenidos para Vidadillo, Garnacha, Derechero y Mazuela. Se calcula la varianza de las 4 medias y esta varianza se multiplica por el número de veces que se analizó cada variedad, en este caso se analizaron 32 muestras de cada variedad.

Así obtendríamos la variabilidad entre grupos, debida a cambiar el factor variedad, en el compuesto isobutirato de etilo.

Una vez calculada la variabilidad entre los grupos, se demuestra mediante el test F si el factor estudiado ejerce un efecto significativo en el resultado. Esto se hace mediante la comparación de la variabilidad dentro de los grupos y entre los grupos.

Los datos obtenidos para isobutirato de etilo se encuentran en la tabla 4.

La variabilidad dentro de los grupos se calcula de la siguiente forma, se calcula la media ponderada de todas las varianzas de los grupos, es decir el promedio de, en el caso del factor variedad, de la varianza de los datos de Vidadillo, Mazuela, Garnacha y Derechero. La varianza dentro de los grupos es 2142,34 para el isobutirato de etilo.

En segundo lugar se calcula la variabilidad entre grupos. Esto se hace calculando la varianza de las medias de cada subfactor, es decir, en el caso del factor variedad, la varianza del promedio de los datos obtenidos para el Vidadillo (227,74ppb), Mazuela (177,88ppb), Garnacha (102,54ppb) y Derechero (108,37ppb). La varianza entre grupos para el isobutirato de etilo fue 3579,31.

La $F_{\text{experimental}}$ resulta de dividir varianza de los promedios*n (32) entre el promedio de las varianzas o lo que es lo mismo, variabilidad del factor entre variabilidad dentro de los grupos.

$$F_{\text{EXPERIMENTAL}} = \frac{\text{VARIANZA DE LOS PROMEDIOS} \cdot \text{NÚMERO DE MEDIDAS}}{\text{PROMEDIO DE LAS VARIANZAS}}$$

La hipótesis nula de este test dice que no hay diferencias significativas al cambiar el factor.

Si $F_{\text{exp}} > F_{\text{crítica}}$ se rechaza esta hipótesis, lo que quiere decir que el factor estudiado tiene un efecto significativo sobre el resultado. La $F_{\text{crítica}}$ se consulta en tablas, la probabilidad es 0,05 y con grados de libertad (n-1) siendo n el número de medidas, en nuestro caso 32 medidas.

MUESTRA	GARNACHA	VIDADILLO	MAZUELA	DERECHERO
3MESES/BARRICA	73,72	167,17	187,17	105,51
3MESES/BARRICA	72,49	172,49	175,23	98,76
3MESES/TOSTADO LIGERO	64,78	170,33	189,8	94,21
3MESES/TOSTADO LIGERO	64,46	173,55	188,64	96,63
3MESES/TOSTADO MEDIO	65,09	168,05	214,16	97,00
3MESES/TOSTADO MEDIO	65,22	160,78	196,95	90,18
3MESES/TOSTADO ALTO	67,97	167,71	259,91	91,50
3MESES/TOSTADO ALTO	65,49	156,55	250,61	93,32
6MESES/BARRICA	114,42	237,97	152,98	123,33
6MESES/BARRICA	110,59	242,3	163,11	122,8
6MESES/TOSTADO LIGERO	101,55	259,29	148,95	61,77
6MESES/TOSTADO LIGERO	109,85	258,26	147,47	101,18
6MESES/TOSTADO MEDIO	96,52	209,42	131,6	0,00

6MESES/TOSTADO MEDIO	79,69	194,43	141,09	0,00
6MESES/TOSTADO ALTO	107,74	245,31	135,13	0,00
6MESES/TOSTADO ALTO	108,25	249,47	161,32	0,00
9MESES/BARRICA	59,07	250,82	187,35	124,76
9MESES/BARRICA	51,79	218,59	165,48	122,04
9MESES/TOSTADO LIGERO	84,42	229,7	130,98	123,46
9MESES/TOSTADO LIGERO	85,98	263,92	178,73	88,11
9MESES/TOSTADO MEDIO	130,93	218,12	135,68	101,72
9MESES/TOSTADO MEDIO	147,09	193,21	143,93	101,64
9MESES/TOSTADO ALTO	129,94	188,09	147,63	89,81
9MESES/TOSTADO ALTO	138,17	204,87	165,92	94,13
12MESES/BARRICA	138,26	256,02	199,45	60,82
12MESES/BARRICA	142,42	281,58	193,91	58,92
12MESES/TOSTADO LIGERO	147,85	300,64	194,38	223,50
12MESES/TOSTADO LIGERO	131,41	295,53	216,01	221,80
12MESES/TOSTADO MEDIO	133,49	268,22	211,96	220,30
12MESES/TOSTADO MEDIO	138,26	282,87	202,99	211,26
12MESES/TOSTADO ALTO	125,37	301,04	180,15	233,38
12MESES/TOSTADO ALTO	129,22	301,66	193,35	216,15
Desviación típica	31,08	47,03	32,70	65,73
Varianza	966,10	2212,06	1069,89	4321,26
Promedio	102,54	227,74	177,87	108,37

Tabla 4. Datos de concentración ($\mu\text{g/L}$) obtenidos para el compuesto isobutirato de etilo en diferentes variedades.

El promedio de las varianzas que aparecen en la tabla 4 es la varianza dentro de los grupos que aparece en la tabla 7. La varianza de los promedios que aparecen en la tabla 4 es la varianza entre los grupos que aparece en la tabla 7.

A continuación se muestra el mismo procedimiento para el compuesto Isobutirato de etilo y los factores tiempo y tipo de conservación.

MUESTRA	3 MESES	6 MESES	9 MESES	12MESES
VIDADILLO/BARRICA	167,17	237,97	250,82	256,02
VIDADILLO/BARRICA	172,49	242,3	218,59	281,58
VIDADILLO/TOSTADO LIGERO	170,33	259,29	229,70	300,64
VIDADILLO/TOSTADO LIGERO	173,55	258,26	263,92	295,53
VIDADILLO/TOSTADO MEDIO	168,05	209,42	218,12	268,22
VIDADILLO/TOSTADO MEDIO	160,78	194,43	193,21	282,87
VIDADILLO/TOSTADO ALTO	167,71	245,31	188,09	301,04
VIDADILLO/TOSTADO ALTO	156,55	249,47	204,87	301,66
DERECHERO/BARRICA	105,51	123,33	124,76	60,82
DERECHERO/BARRICA	98,76	122,8	122,04	58,92
DERECHERO/TOSTADO LIGERO	94,21	61,77	123,46	223,50
DERECHERO/TOSTADO LIGERO	96,63	101,18	88,11	221,80
DERECHERO/TOSTADO MEDIO	97,00	0,00	101,72	220,30
DERECHERO/TOSTADO MEDIO	90,18	0,00	101,64	211,26
DERECHERO/TOSTADO ALTO	91,50	0,00	89,81	233,38
DERECHERO/TOSTADO ALTO	93,32	0,00	94,13	216,15
GARNACHA/BARRICA	73,72	114,42	59,07	138,26
GARNACHA/BARRICA	72,49	110,59	51,79	142,42

GARNACHA/TOSTADO LIGERO	64,78	101,55	84,42	147,85
GARNACHA/TOSTADO LIGERO	64,46	109,85	85,98	131,41
GARNACHA/TOSTADO MEDIO	65,09	96,52	130,93	133,49
GARNACHA/TOSTADO MEDIO	65,22	79,69	147,09	138,26
GARNACHA/TOSTADO ALTO	67,97	107,74	129,94	125,37
GARNACHA/TOSTADO ALTO	65,49	108,25	138,17	129,22
MAZUELA/BARRICA	93,03	152,98	187,35	199,45
MAZUELA/BARRICA	94,37	163,11	165,48	193,91
MAZUELA/TOSTADO LIGERO	89,60	148,95	130,98	194,38
MAZUELA/TOSTADO LIGERO	83,97	147,47	178,73	216,01
MAZUELA/TOSTADO MEDIO	88,05	131,6	135,68	211,96
MAZUELA/TOSTADO MEDIO	83,00	141,09	143,93	202,99
MAZUELA/TOSTADO ALTO	82,88	135,13	147,63	180,15
MAZUELA/TOSTADO ALTO	79,14	161,32	165,92	193,35
Desviación típica	38,58	75,72	54,69	66,62
Varianza	1488,52	5734,33	2991,87	4438,92
Promedio	104,28	134,86	146,75	200,38

Tabla 5. Datos de concentraciones ($\mu\text{g/L}$) obtenidos en 2009 para el isobutirato de etilo en diferentes tiempos de conservación.

El promedio de las varianzas que aparecen en la tabla 5 es la varianza dentro de los grupos que aparece en la tabla 8.

La varianza de los promedios que aparecen en la tabla 5 es la varianza entre los grupos que aparece en la tabla 8.

MUESTRA	BARRICA	TOSTADO LIGERO	TOSTADO MEDIO	TOSTADO ALTO
3MESES/VIDADILLO	22,57	22,56	23,98	22,52
3MESES/VIDADILLO	23,27	22,44	21,57	21,66
3MESES/DERECHERO	21,49	20,75	21,14	19,44
3MESES/DERECHERO	21,72	21,51	19,84	20,20
3MESES/GARNACHA	16,12	14,02	13,88	13,99
3MESES/GARNACHA	15,64	13,97	13,21	14,28
3MESES/MAZUELA	14,23	13,01	13,02	12,03
3MESES/MAZUELA	13,54	12,73	12,56	11,35
6MESES/DERECHERO	30,23	30,71	30,19	32,13
6MESES/DERECHERO	31,82	33,35	32,69	30,2
6MESES/MAZUELA	22,74	22,58	20,91	23,81
6MESES/MAZUELA	23,90	22,11	23,79	24,52
6MESES/GARNACHA	23,87	21,58	19,81	21,96
6MESES/GARNACHA	17,82	21,36	21,03	22,43
6MESES/VIDADILLO	27,80	33,33	27,43	29,55
6MESES/VIDADILLO	29,91	32,37	25,55	32,55
9MESES/MAZUELA	25,04	19,41	17,37	22,03
9MESES/MAZUELA	20,79	23,14	21,09	21,67
9MESES/VIDADILLO	26,32	25,76	26,33	21,86
9MESES/VIDADILLO	24,41	28,52	22,49	23,45
9MESES/DERECHERO	22,01	21,73	18,22	17,59
9MESES/DERECHERO	21,17	18,08	18,16	18,13
9MESES/GARNACHA	12,11	16,29	27,63	24,27
9MESES/GARNACHA	10,22	16,39	27,28	26,46

12MESES/DERECHERO	11,04	44,21	44,36	47,53
12MESES/DERECHERO	11,35	46,43	42,18	44,46
12MESES/MAZUELA	32,81	29,28	31,34	27,86
12MESES/MAZUELA	30,07	29,26	31,17	29,13
12MESES/GARNACHA	27,46	31,95	26,63	23,72
12MESES/GARNACHA	29,21	25,79	27,28	25,26
12MESES/VIDADILLO	31,45	35,77	29,26	33,56
12MESES/VIDADILLO	35,7	33,99	32,36	35,65
Desviación típica	7,01	8,44	7,56	8,17
Varianza	49,15	71,32	57,25	66,81
Promedio	22,74	25,13	24,49	24,85

Tabla 6. Datos de concentraciones ($\mu\text{g/L}$) obtenidos en 2009 para el isobutirato de etilo en diferentes tipos de conservación.

El promedio de las varianzas que aparecen en la tabla 6 es la varianza dentro de los grupos que aparece en la tabla 9.

La varianza de los promedios que aparecen en la tabla 6 es la varianza entre los grupos que aparece en la tabla 9.

En los anexos se encuentran las tablas de concentraciones de los 3 factores para el hexanoato de etilo (tablas 1a, 3a y 5a) y para el 4-etilfenol (tablas 6a, 8a y 9a).

Como ejemplo para el cálculo del test de Fisher, ilustro la siguiente tabla 7 con los 3 compuestos estudiados, donde se observa la $F_{\text{crítica}}$ y la $F_{\text{experimental}}$ calculada. Puede observarse que en todos los casos la $F_{\text{experimental}}$ supera la $F_{\text{crítica}}$ y por tanto las diferencias observadas en el nivel de los 3 compuestos depende de la variedad de la uva materia prima.

Compuesto	Varianza dentro de los grupos	Varianza entre grupos	Número de medidas	$F_{\text{experimental}}$	$F_{\text{crítica}} (n-1)$	SIGNIFICANCIA
Isobutirato de etilo	2142,34	3579,31	32	53,46	1,84	SI
Hexanoato de etilo	2,34 E-03	5,84 E-04	32	7,96	1,84	SI
4-etilfenol	1265,83	133,13	32	3,36	1,84	SI

Tabla 7 Significatividad del factor variedad en los compuestos mostrados.

Además de este factor se ha trabajado de la misma forma con los otros factores. Adjunto los resultados de los 3 compuestos para los factores tiempo y tipo de conservación (tablas 8 y 9).

Compuesto	Varianza dentro de los grupos	Varianza entre grupos	número de medidas	$F_{\text{experimental}}$	$F_{\text{crítica}} (n-1)$	SIGNIFICANCIA
Isobutirato de etilo	3663,41	1606,95	32	14,03	1,84	SI
Hexanoato de etilo	2,25 E-03	6,98397 E-04	32	9,92	1,84	SI
4-etilfenol	1339,161759	38,41	32	0,92	1,84	NO

Tabla 8. Significatividad del factor tiempo de conservación.

Como puede verse en la tabla 8, los niveles de isobutirato y hexanoato de etilo dependen significativamente del tiempo de conservación, el primero aumenta con el tiempo. Sin embargo los niveles de 4-etilfenol no varían con el tiempo de conservación, es cierta la hipótesis nula, su variabilidad es aleatoria.

Compuesto	Varianza dentro de los grupos	Varianza entre grupos	Número de medidas	F _{experimental}	F _{critica} (n-1)	SIGNIFICANCIA
Isobutirato de etilo	61,13	1,15	32	0,60	1,84	NO
Hexanoato de etilo	2,76 E-03	4,82 E-05	32	0,56	1,84	NO
4-etilfenol	1316,76	67,34	32	1,64	1,84	NO

Tabla 9. Significatividad del factor tipo de conservación.

Puede observarse en la tabla 9, que ni los niveles de ésteres ni de 4-etilfenol varían según el tipo de conservación.

A continuación se procede al cálculo de la mínima diferencia significativa para el isobutirato de etilo, para ver a partir de qué valor hay cambio significativo. Lo calculo solo para los factores, que según el test F ejercen significancia en el resultado (variedad y tiempo de conservación), el procedimiento que se sigue es el explicado en el apartado de métodos.

Para el factor variedad, pasamos a calcular LSD al 95% con 124 grados de libertad.

El *standard error of differences* es $\sqrt{\frac{2}{32}} * \sqrt{2142,33} = 11,57$. Como t_{res} es 1,98, la LSD es 22,90 µg/L.

	LSD = 22,90 ppb	GARNACHA	VIDADILLO	MAZUELA	DERECHERO
	Promedios	102,54	227,74	177,87	108,37
GARNACHA	102,54	0,00	125,20	75,32	5,82
VIDADILLO	227,74	-125,20	0,00	-49,87	-119,37
MAZUELA	177,87	-75,32	49,87	0,00	-69,50
DERECHERO	108,37	-5,82	119,37	69,50	0,00

Tabla 10. Diferencias en las medias de concentración (ppb) de isobutirato de etilo para las 4 variedades.

Se puede comprobar, al comparar las diferencias entre medias y la mínima diferencia significativa (22,90) que existe diferencia significativa en el nivel de isobutirato de etilo entre todas las variedades, excepto en la pareja Garnacha-Derechero, donde la diferencia de las medias es 5,82 ppb.

En los anexos se puede observar que para el factor variedad, en el hexanoato de etilo hay significancia entre todos los grupos excepto para el Garnacha-Mazuela y Mazuela-Vidadillo (tabla 2a). Para el 4-etilfenol se observa que únicamente hay una clara significancia entre la variedad Vidadillo y el resto de variedades (tabla 7a).

Para el factor tiempo de conservación, siguiendo el mismo procedimiento la LSD es 29,94 ppb.

	LSD = 29,94 ppb	3MESES	6MESES	9MESES	12MESES
	Promedios	104,28	134,86	146,75	200,38
3MESES	104,28	0,00	30,58	42,47	96,09
6MESES	134,86	-30,58	0,00	11,88	65,51
9MESES	146,75	-42,47	-11,88	0,00	53,62
12MESES	200,38	-96,09	-65,512	-53,62	0,00

Tabla 11. Diferencias en las medias de concentración (ppb) de isobutirato de etilo para los 4 tiempos de conservación.

Se comprueba que para los tiempos de conservación también hay diferencia entre todos ellos menos para la pareja 6meses-9meses, ya que no superan la mínima diferencia significativa.

En el anexo se puede ver que para el factor tiempo de conservación en el hexanoato de etilo en todas las parejas hay significancia menos en la 12 meses- 3meses que no supera la mínima diferencia significativa (tabla 4a). La tabla del 4-EF no se muestra ya que, según el test F, para este compuesto el factor tiempo de conservación no es significativo.

Para el tipo de conservación, se observó que en el isobutirato no ejercía significancia, por eso no calculamos LSD.

De forma manual, siguiendo lo aprendido en el grado, se han tratado los datos suponiendo que no hay interacciones entre los factores, por ejemplo se supone que la evolución con el tiempo es igual en todas las variedades. Esto puede no ser cierto y por tanto deben tratarse los datos considerando las interacciones entre factores.

Debido a la complejidad que supone pasar de un anova de 1 factor a un anova de 3 factores con interacción, se utiliza un Software específico de quimiometría. Este ANOVA de 3 factores con interacciones se ha realizado de forma automática con el software descrito en Material y Métodos. Se seleccionó el número de interacciones deseadas, en este caso 3: (tipo de conservación x tiempo de conservación, tipo de conservación x variedad y variedad x tiempo de conservación).

Los resultados de la probabilidad (p) de la significatividades encontradas aparecen en la siguiente tabla 18. Aparecen marcadas en verde aquellas que indican ausencia de significatividad, considerando la probabilidad del 95%.

COMPUESTOS MAYORITARIOS	VARIEDAD	TIEMPO DE CONSERVACIÓN	TIPO DE CONSERVACIÓN	VARIEDAD X TIEMPO	VARIEDAD X TIPO	TIPO X TIEMPO
Acetaldehido	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	8,12E-01
Propanoato de etilo	<0,0001	<0,0001	2,52E-01	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Diacetilo	<0,0001	<0,0001	8,30E-02	<0,0001	9,91E-01	1,40E-02
Butirato de etilo	<0,0001	<0,0001	3,01E-01	<0,0001	7,00E-03	3,00E-03
Isobutanol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Acetato de Isoamilo	<0,0001	<0,0001	6,50E-02	<0,0001	0,00E+00	1,00E-03
Butanol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Alcohol Isoamílico	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Hexanoato de etilo	<0,0001	<0,0001	1,86E-01	<0,0001	3,00E-03	5,10E-02
Acetoina	<0,0001	<0,0001	2,01E-01	0,00E+00	0,00E+00	3,62E-01
Lactato de etilo	<0,0001	<0,0001	0,00E+00	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Hexanol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
c3-Hexenol	<0,0001	<0,0001	4,90E-01	<0,0001	1,00E-03	5,00E-03
Octanoato de etilo	<0,0001	<0,0001	2,15E-01	<0,0001	1,00E-03	4,00E-03
Ácido Isobutírico	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
g-Butirolactona	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ácido butírico	<0,0001	<0,0001	2,20E-02	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Succinato de dietilo	<0,0001	<0,0001	6,70E-02	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ácido hexanoico	<0,0001	<0,0001	0,00E+00	<0,0001	<0,0001	<0,0001
alcoholbencílico	<0,0001	<0,0001	5,05E-01	<0,0001	8,95E-01	9,48E-01
β-feniletanol	<0,0001	<0,0001	1,97E-03	<0,0001	<0,0001	3,45E-02
Ácido octanoico	<0,0001	<0,0001	1,00E-03	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ácido Decanoico	<0,0001	<0,0001	1,00E-03	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Acetato de etilo	<0,0001	<0,0001	3,00E-03	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Ácido Acético	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Decanoato etilo	<0,0001	<0,0001	2,48E-02	<0,0001	<0,0001	6,17E-04
Isovalerianico	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Metionol	<0,0001	<0,0001	6,64E-04	<0,0001	1,67E-04	1,07E-01
Acet. Feniletilo	<0,0001	<0,0001	5,07E-02	<0,0001	3,37E-03	1,01E-01

COMPUESTOS MINORITARIOS	VARIEDAD	TIEMPO DE CONSERVACIÓN	TIPO DE CONSERVACIÓN	VARIEDAD X TIEMPO	VARIEDAD X TIPO	TIPO X TIEMPO
Benzaldehido	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Linalol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Fenilacetaldehido	<0,0001	<0,0001	5,68E-02	<0,0001	1,09E-03	2,34E-01
α-Terpineol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
β-Citronelol	<0,0001	<0,0001	6,60E-02	<0,0001	<0,0001	<0,0001
β-Damascenona	<0,0001	<0,0001	2,00E-03	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Geraniol	<0,0001	<0,0001	4,00E-03	<0,0001	<0,0001	1,10E-02
Guaiacol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Dihidrocinnamato de etilo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	1,00E-03
(E)-Whiskylactona	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
β-Ionona	<0,0001	<0,0001	3,56E-01	<0,0001	<0,0001	2,27E-01
o-Cresol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
4-Etilguaiacol	4,00E-02	2,15E-01	5,60E-02	6,71E-01	1,26E-01	5,30E-01
γ-Nonalactona	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
m-Cresol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

4-Propilguaiacol	4,29E-02	4,30E-02	6,71E-02	5,43E-01	2,22E-03	6,20E-01
Cinamato de etilo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	3,41E-01
4-Etilfenol	2,80E-02	4,32E-01	1,91E-01	7,04E-01	2,93E-01	6,15E-01
δ-Decalactona	<0,0001	<0,0001	1,90E-02	<0,0001	<0,0001	3,41E-01
4-Vinilguaiacol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,00E+00
4-Alil-2,6-Dimetoxifenol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Vainillina	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Vanillato de metilo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Vanillato de etilo	<0,0001	<0,0001	1,12E-01	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Acetovanillona	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,00E+00
Isobutirato de etilo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Acetato isobutilo	<0,0001	<0,0001	1,76E-01	<0,0001	1,00E-03	<0,0001
Acetato butilo	< 0,0001	< 0,0001	8,46E-02	< 0,0001	2,17E-03	9,08E-03
2-Metilbutirato de etilo	<0,0001	<0,0001	1,00E-03	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Isovalerato de etilo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Acetato de linalol	< 0,0001	< 0,0001	6,84E-02	< 0,0001	7,01E-03	2,80E-01
Furoato de etilo	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
g-Decalactona	< 0,0001	< 0,0001	4,23E-04	< 0,0001	2,06E-03	6,12E-01
Eugenol	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Isoeugenol II	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Phenol, 2,6-dimethoxy	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
c-Whiskylactona	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tabla 18: Datos de significatividad (p) para cada factor e interacción para los compuestos mayoritarios y minoritarios del aroma. Ausencia de significatividad $p > 0,05$. Significatividad al 95%: $0,05 > p > 0,01$. Significatividad al 99%: $0,01 > p > 0,001$. Significatividad al 99,9%: $< 0,001 > p > 0,0001$

Se seleccionaron 3 compuestos en los que se vio variabilidad diferente

-Isobutirato de etilo: todos los factores y todas las interacciones ejercen significancia en el resultado.

-Hexanoato de etilo: todos los factores menos el tipo de conservación y la interacción tiempo de conservación ejercen significancia en el resultado.

-4-etilfenol: la variabilidad del nivel de 4-etilfenol (4EF) es aleatoria en todos los casos, con la excepción del factor variedad. Con un 95% de probabilidad podemos decir que hay diferencia significativa en los niveles de 4EF según la variedad de uva.

Se representó la variabilidad de la concentración de los 3 compuestos según los diferentes factores. Como ejemplo expongo la gráfica de la variabilidad del isobutirato de etilo. (Figura 4, Figura 5, Figura 6, Figura 7, Figura 8 y Figura 9).

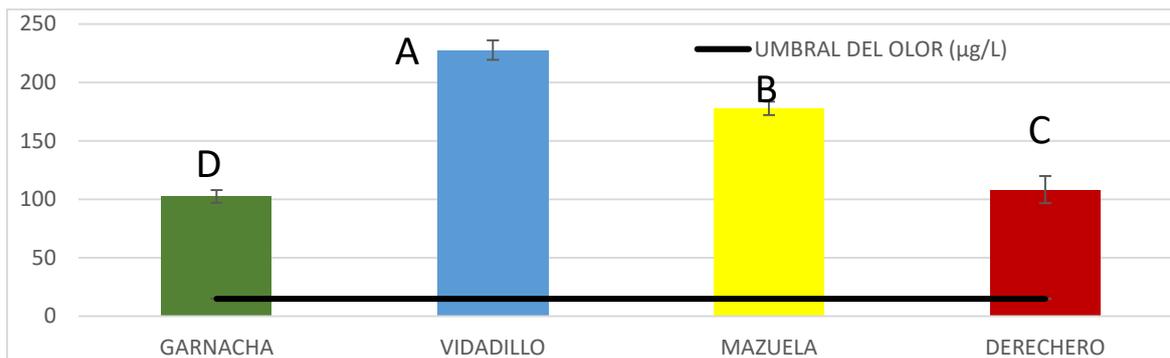


Figura 4: Media ($\mu\text{g/L}$) e intervalo de confianza ($\pm\frac{s}{\sqrt{n}}$) del contenido de isobutirato de etilo en cada una de las variedades.

Se puede comprobar que este compuesto destaca en la variedad Vidadillo. Y en todos los casos la concentración supera el umbral de olfacción, por lo que es un compuesto importante sensorialmente. Como se ve en el anexo (figura 1a), el hexanoato de etilo destaca la variedad Derechero y el 4-etilfenol destaca en la variedad Vidadillo (figura 7a). El factor variedad es un factor significativo para los 3 compuestos. Pero hay una diferencia, los dos ésteres superan el umbral de olfacción, pero la concentración del fenol es inferior, por lo que la importancia aromática no será tan importante.

Al hacer el análisis, el programa realiza el método comparación por pares de Fisher tipo III con probabilidad 0,05 entre los niveles del compuesto, en este caso, para cada variedad. Letras distintas significa que se diferencian significativamente. Se aplica esto en todas las gráficas.

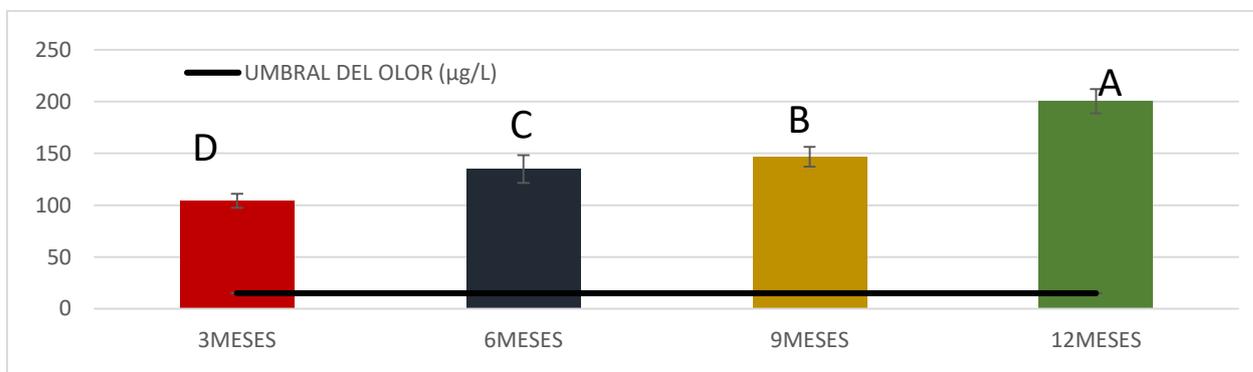


Figura 5 Media ($\mu\text{g/L}$) e intervalo de confianza ($\pm\frac{s}{\sqrt{n}}$) del contenido de isobutirato de etilo en cada uno de los tiempos de conservación.

Se observa claramente que al aumentar el tiempo de conservación aumenta la cantidad de isobutirato, habiendo diferencias significativas con un 99,9 % de probabilidad entre los 3, 6, 9 y 12 meses. En todos los casos el nivel supera el umbral de olfacción, por lo que es importante sensorialmente. Como se ve en los anexos, en el hexanoato de etilo se observa que la máxima concentración se obtiene a los 6 meses y la mínima a los 3 (figura 2a). Este factor es significativo para el isobutirato y el hexanoato de etilo. Para el 4-etilfenol el tipo de conservación no es un factor significativo (figura 8a).

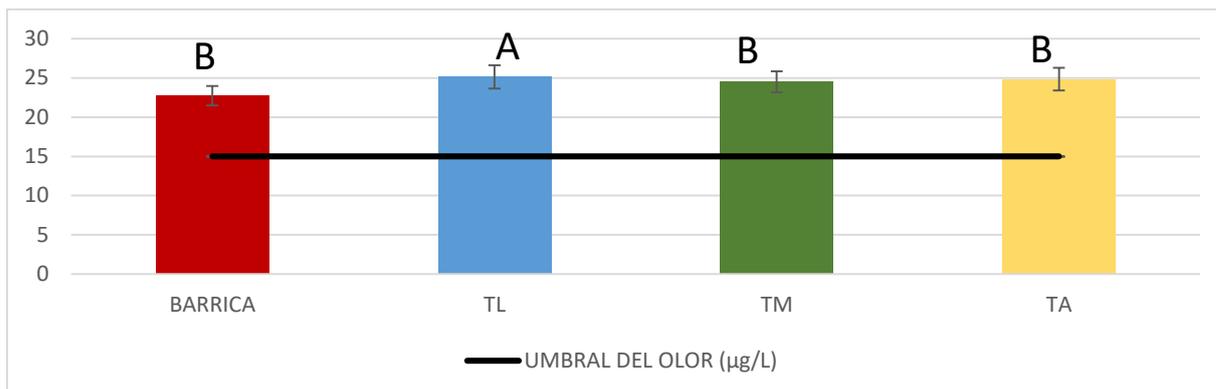


Figura 6 Media ($\mu\text{g/L}$) e intervalo de confianza ($\pm\frac{s}{\sqrt{n}}$) del contenido de isobutirato de etilo en cada uno de los tipos de conservación.

Se puede observar en la figura 6 que los vinos elaborados con chips de tostado ligero tienen un contenido significativamente más alto de isobutirato de etilo que los vinos que utilizaron otro tipo de conservación. En la tabla 18 puede observarse que ni para el hexanoato de etilo (figura 3a), ni para el 4EF (figura 9a) hay diferencias significativas dependiendo del tipo de conservación.

En la figura 7 puede observarse la interacción entre los factores tiempo de conservación y variedad. Es significativa para el isobutirato de etilo. Puede observarse que la variación de la concentración de isobutirato de etilo con el tiempo no es exactamente igual para las 4 variedades

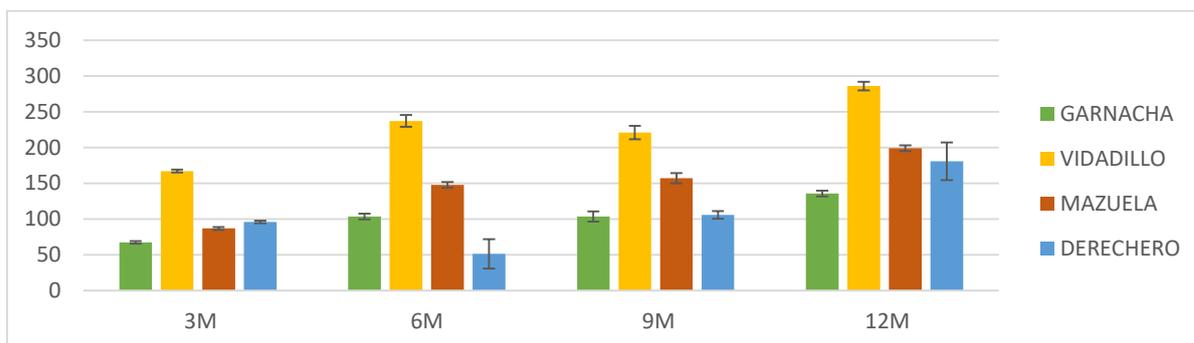


Figura 7. Concentraciones de isobutirato de etilo ($\mu\text{g/L}$), para las diferentes variedades a lo largo del tiempo de conservación.

Los vinos de la variedad Derechero tienen un mínimo de isobutirato de etilo a los 6 meses y el resto de variedades a los 3 meses de conservación. En los anexos, para la interacción variedad x tiempo, observamos que en el hexanoato de etilo el máximo de todas las variedades se encuentra en 6 meses, menos Vidadillo que lo hace en 12 meses, también se observa que para la variedad Derechero la concentración decrece a partir de los 6 meses mientras que para la variedad Vidadillo aumenta (figura 4a). La concentración de 4EF no varía de forma significativa según la interacción variedad x tiempo de conservación (figura 10a).

En la figura 8 puede observarse la interacción entre los factores variedad y tipo de conservación. Es significativa para el isobutirato de etilo. Lo que afecta el tipo de conservación a la concentración de isobutirato de etilo es diferente dependiendo de la variedad.

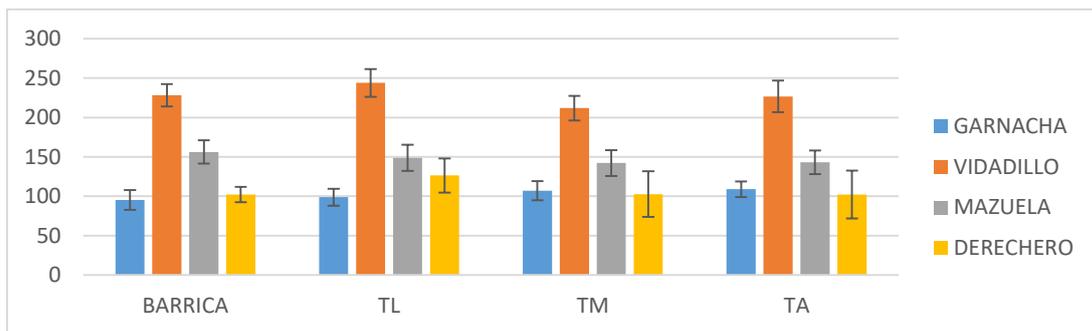


Figura 8. Concentración de isobutirato de etilo ($\mu\text{g/L}$) para las diferentes variedades dependiendo del tipo de conservación.

En barrica, los vinos de la variedad Mazuela tienen el máximo de concentración de isobutirato de etilo, sin embargo Vidadillo y Derechero lo tienen cuando se aplican chips con tostado ligero. En los anexos, para la interacción variedad x tipo de conservación, observamos que el hexanoato de etilo en los vinos de Garnacha y el Derechero tiene contenidos máximos en barrica y tostado ligero; en cambio los vinos de Vidadillo tienen contenidos mínimos cuando la conservación es en barrica; y los vinos de Mazuela tienen la concentración máxima cuando se conservan en barrica (figura 5a). Para el 4EF, no hay significatividad en esta interacción (figura 11a).

En la figura 9 puede observarse la interacción entre los factores tiempo de conservación y tipo de conservación. Es significativa para el isobutirato de etilo. Podemos observar por ejemplo que a los 3 meses, los vinos procedentes de chips de tostado alto son los que tienen menor concentración del éster, sin embargo a los 6 meses los de menor concentración son los de chips con tostado medio o a los 12 meses los vinos envejecidos en barrica.

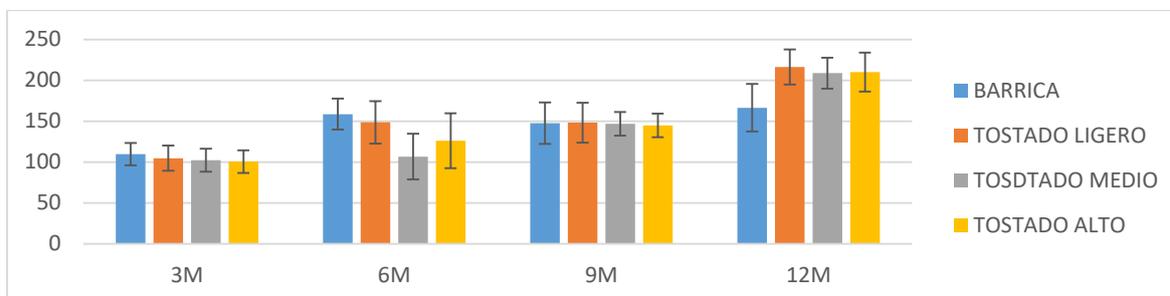


Figura 9. Concentración de isobutirato de etilo ($\mu\text{g/L}$) para los diferentes tipos de conservación, a lo largo del tiempo.

En los anexos para la interacción tiempo x tipo de conservación, observamos que las concentraciones de hexanoato de etilo y 4-etilfenol no varían de forma diferente significativamente con el tiempo dependiendo del tipo de conservación (figura 6a y 12a)

5. CONCLUSIONES

5.1 General: El estudio estadístico y quimiométrico es de gran utilidad cuando se necesita saber la variabilidad entre un gran número de muestras y saber de qué factores provienen esas variaciones.

5.2 Específica: En este trabajo se ha podido comprobar que no todos los factores influyen de la misma forma en la concentración de los diferentes compuestos aromáticos del vino.

También se ha visto la necesidad de tener en cuenta la interacción entre los distintos factores estudiados para poder sacar conclusiones reales. Por ejemplo el tipo de conservación no es significativo para los 3 compuestos estudiados si hacemos un análisis de la varianza de un factor, pero al considerar los 3 factores y sus interacciones la concentración de isobutirato de etilo se muestra dependiente del tipo de conservación. Se ha podido relacionar los compuestos estudiados con los factores que definen las muestras.

6. BIBLIOGRAFIA

¹ Ferreira V.; Escudero A.; Campo E.; Cacho J. The chemical foundations of wine aroma: a role game aiming at wine quality, personality and varietal expression. Proceeding Australia, 28 July 2007.

² Escudero A.; Campo E.; Fariña L.; Cacho J.; Ferreira V. Analytical Characterization of the Aroma of the five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4501-4510.

³ López R. Caracterización Química y Métodos de Análisis de sus principales odorantes. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, 26, Abril, 1999.

⁴ Ferreira V.; Fernández P.; Peña C.; Escudero A.; Cacho J. Investigation on the Role Played by Fermentation Esters in the Aroma of Young Spanish Wines by Multivariate Analysis. *J Sci Food Agric.* 1995, 67, 381-392.

⁵ Ferreira V.; López R.; Escudero A.; Cacho J. The Aroma of Grenache Red Wine: Hierarchy and Nature of its Main Odorants. *J Sci Agric.* 1998, 77, 259-267.

⁶ Ferreira V.; Ortin N.; Escudero A.; López R.; Cacho J. Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4048-4054.

⁷ Béteau J.; Roig Josa G. Los chips de roble como herramienta de vinificación y crianza. [Online] http://www.acenologia.com/ciencia76_01.htm

⁸ Ferreira González V. *Conceptos básicos de Quimiometría y control de calidad en Química Analítica*, 2ª edición; Universidad de Zaragoza, 2006, vol1, 141.

⁹ Ortega C.; López R.; Cacho J.; Ferreira V. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromatogr. A*; 10, Mayo, 2001, 205-214.

¹⁰ López R.; Aznar M.; Cacho J.; Ferreira V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*; 17, Mayo 2002, 167-177.

¹¹ San Jan F.; Cacho J.; Ferreira V.; Escudero A. Aroma Chemical Composition of Red Wines from Different Price Categories and Its Relationship to Quality. *Journal J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 5045-5056.

¹² Kheir J.; Salameh D.; Strehaiano P.; Brandam C.; Lteif R. Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *Eur Food Res Technol* 2013, 237, 655-67.