

Trabajo Fin de Máster

Compuestos polifenólicos en vinos de Tenerife: determinación e influencia del tipo de vino

Sonia Montoro Hernández

Tutor: José Elías Conde González

**Área de conocimiento: Química Analítica, Biomedicina y Ciencia
y Tecnología de Alimentos (TA)**

Departamento de Química

Curso 2019-2020

Dr. José Elías Conde González (DNI 42085684P), Profesor Titular del Departamento de Química, Unidad Departamental de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de La Laguna.

Expone que como *tutor del Trabajo Fin de Máster titulado* “Compuestos polifenólicos en vinos de Tenerife: determinación e influencia del tipo de vino”, realizado por Dña. Sonia Montoro Hernández,

Autoriza la presentación de la Memoria de dicho Trabajo Fin de Máster.



En La Laguna, a 1 de septiembre de 2020

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a toda mi familia por ofrecer su apoyo incondicional y nunca dejarme decaer. A mis estimados padres por darme ese empujoncito que a veces necesito para seguir adelante. A mis queridos hermanos y cuñado por siempre brindarme frescura y momentos inolvidables. Y, por último, pero no menos importante, a mi más apreciado tío Felo por preocuparse en darme siempre lo mejor y por aportarme sabias palabras, eres muy especial para mí...

A todos mis amigos, por llenarme la vida de felicidad y por estar presentes tanto para lo bueno como para lo malo. En especial a mi mejor amiga Ari que prácticamente hemos compartido la vida entera y nos conocemos de los pies a la cabeza. ¡Menudas aventuras hemos vivido! Es que de solo pensarlo me caigo de la risa. Gracias por aguantar todos mis dramas y, sobre todo, por aguantarme en épocas de estrés.

A mis compañeros de máster, que aún sigo anonadada con el buen feeling que se ha creado entre todos nosotros, juntos hemos hecho una piña y nos hemos apoyado los unos a los otros en todo momento. Espero que esto no sea un adiós para siempre y podamos reencontrarnos de nuevo, ¡que todavía queda pendiente la chuletada!

A mis compañeras que han estado en el laboratorio trabajando también con su proyecto final. En especial agradecer a Ana, que se ha ofrecido a recorrerse la isla entera para realizar la recogida de muestras de vinos que, sin su ayuda, no habría sido posible trabajar con un elevado número de muestras.

A mi tutor Elías que no solo ha estado ahí para orientarme y ayudarme a la realización de este trabajo sino también para ofrecerme grandes e inolvidables momentos dentro del laboratorio que han hecho que me sienta completamente integrada en el equipo y que los días se me pasen volando. Gracias por confiar en mí una vez más, por aportarme sabiduría y por ayudarme a ser la mejor versión de mí misma.

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos químicos que otorgan características propias de los vinos como es el color, el cuerpo y la astringencia. Al presentar una estructura química muy diversa estos compuestos exhiben diferentes propiedades. Estos compuestos pueden influir en la salud humana, pues se caracterizan principalmente por tener actividad antioxidante, ayudando a prevenir ciertas enfermedades.

En este trabajo se empleó un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación y cuantificación de polifenoles con el empleo de detectores de Fluorescencia (FL) y Visible-Ultravioleta (Vis-UV).

La metodología desarrollada se aplicó a la determinación y caracterización de polifenoles en muestras de diferentes tipos de vino con denominación de origen de la isla de Tenerife. Se trabajó con los siguientes polifenoles: ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido siríngico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vaníllico, ácido salicílico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, (+)-catequina, (-)-epicatequina y trans-veratrol. Se investigó el efecto matriz de los diferentes vinos sobre la separación cromatográfica. Los resultados muestran que la materia orgánica presente en los vinos influye en la respuesta cromatográfica de los polifenoles. Se realizó un estudio estadístico de los resultados obteniéndose una buena clasificación por tipo de vino.

Palabras claves: vinos canarios, polifenoles, compuestos polifenólicos, clasificación de polifenoles, determinación de polifenoles, estudio quimiométrico de polifenoles, prevención de enfermedades.

ABSTRACT

Polyphenols are chemical compounds that provide the characteristics of wines such as color, body and astringency. Due to have a very diverse chemical structure, these compounds present different properties. As polyphenols have a very diverse chemical structure, they can exhibit certain properties. These compounds can influence human health, because they are mainly characterized by having antioxidant activity, helping to prevent certain diseases.

In this work, a method based on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used for the separation and determination of polyphenols using either Fluorescence and Vis-UV detectors.

The developed methodology was applied to the determination and characterization of polyphenols in samples of different types of wine with designation of origin from the island of Tenerife. We work with the following polyphenols: gallic acid, protocatechuic acid, syringic acid, p-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, salicylic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, synaptic acid, (+)-catechin, (-)-epicatechin and trans-resveratrol. The matrix effect of the different wines on the chromatographic separation was investigated. The results show that the organic matter present in the wines influences the chromatographic response of polyphenols. A statistical study of the results was carried out and the results show a good classification by type of wine.

Keywords: Canarian wines, polyphenols, polyphenolic compounds, classification of polyphenols, determination of polyphenols, chemometric study of polyphenols, prevention of diseases.

INDICE GENERAL

1. Introducción	7
2. Materiales y métodos	11
2.1. <i>Reactivos</i>	11
2.2. <i>Preparación de las disoluciones</i>	11
2.2.1. <i>Disoluciones individuales de compuestos polifenólicos</i>	11
2.2.2. <i>Disolución madre de compuestos polifenólicos</i>	11
2.2.3. <i>Disolución del estándar interno</i>	12
2.2.4. <i>Disolución de vino sintético</i>	12
2.2.5. <i>Muestras de vino</i>	12
2.3. <i>Aparatos</i>	13
2.4. <i>Instrumentación</i>	13
2.4.1. <i>Condiciones cromatográficas</i>	13
2.5. <i>Software</i>	14
2.6. <i>Análisis estadístico</i>	14
3. Resultados y discusión	14
3.1. <i>Identificación de los polifenoles</i>	14
3.2. <i>Efecto matriz sobre los tiempos de retención de los polifenoles</i>	17
3.3. <i>Curva de calibrado</i>	18
3.4. <i>Repetibilidad y reproducibilidad</i>	18
3.5. <i>Determinación del contenido polifenólico en muestras de vino.</i>	20
3.6. <i>Análisis Exploratorio de los Perfiles Polifenólicos presentes en los vinos</i>	24
4. Conclusiones	35
5. Bibliografía	36

1. Introducción

Los polifenoles constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas que intervienen en el crecimiento y reproducción de las mismas, participan en procesos de defensa frente a patógenos o a la radiación ultravioleta y son responsables de su pigmentación [1-3]. Se encuentran principalmente en las frutas y hortalizas, así como en las legumbres y en algunas bebidas (cerveza, té, café, zumos cítricos y vino) [1]. En enología estos compuestos juegan un papel significativo en las características del vino tales como el gusto amargo y la astringencia, en el color y en fenómenos de enturbiamiento y pardeamiento [4,5].

Los compuestos fenólicos tienen una estructura química muy diversa caracterizada por presentar al menos un grupo hidroxilo unido directamente a un anillo aromático [1, 3,5]. Dentro de los compuestos fenólicos se pueden encontrar desde moléculas simples hasta polímeros complejos [3,6]. De acuerdo a su estructura química, los compuestos polifenólicos se clasifican en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides.

En los polifenoles no flavonoides se incluyen los ácidos fenólicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico. Existen de forma predominante como ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1) e hidroxicinámicos (C6-C3) (**Figura 1**). Los ácidos fenólicos se encuentran especialmente en las pieles de la uva, pero también en la pulpa de la misma. Como representantes más importantes de ácidos hidroxibenzoicos se pueden citar los ácidos protocatéquico, sirínico, vanílico y gálico. Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en mayor concentración tanto en el vino blanco como en el vino tinto. A este grupo pertenecen los ácidos p-cumárico, caféico y ferúlico. Dentro de los polifenoles no flavonoides también se incluyen los estilbenos que están formado por dos anillos de benceno unidos a través de una molécula de etanol o etileno (C6-C2-C6) (**Figura 1**). Los estilbenos pueden estar libres o formando polímeros. El resveratrol es el más representativo y su isómero trans se produce en la vid como respuesta a infecciones fúngicas o a la luz ultravioleta [5,6]. No influyen en las características sensoriales de los vinos, pero se ha convertido en un tema de investigación por sus posibilidades terapéuticas [2, 7].

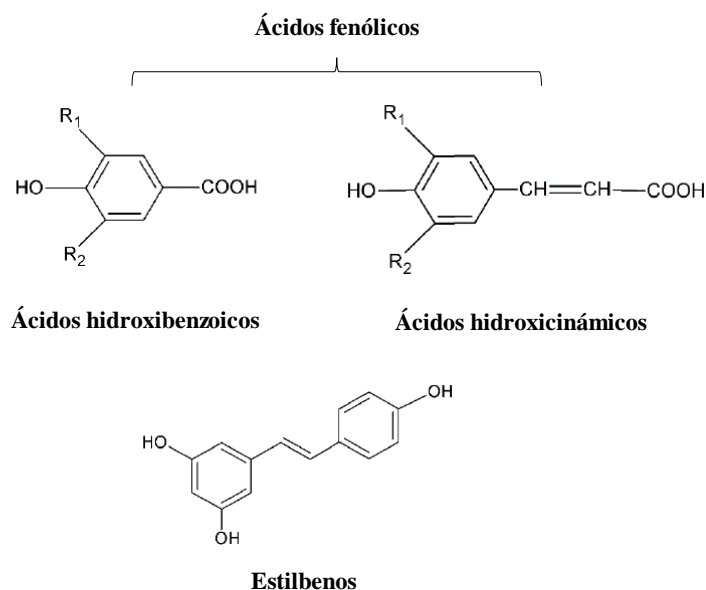


Figura 1. Estructuras básicas de los compuestos no flavonoides. (adaptada de [5])

Los polifenoles flavonoides contienen una cadena principal de 15 átomos de carbono que comprende dos anillos de benceno (A y B) unidos por un heterociclo (C) (**Figura 2**). Dependiendo del heterociclo, los flavonoides se pueden separar en tres subgrupos: flavonoles, antocianinas y flavanoles. Los flavanoles (flavan-3-ols) es el grupo más abundante tanto en la uva como en el vino. Forman un gran grupo de catequinas (monómeros) y taninos condensados o proantocianidinas (polímeros). Los principales monómeros de flavanoles son (+)-catequina y su enantiómero la (-)-epicatequina. Estas sustancias influyen considerablemente en la astringencia y el amargor de los vinos resultantes. Los flavonoles son los segundos más abundantes en las uvas. Los principales flavonoles son, en orden decreciente de abundancia, la quercetina, miricetina, isorhamnetina y kaempferol. Actúan como protectores de la radiación ultravioleta. Por último, las antocianinas son pigmentos solubles responsables del color de la uva y del vino. Las antocianinas en el vino son libres (agliconas) o glucosiladas. Las antocianinas reaccionan con catequinas, proantocianidinas y otros componentes del vino durante el envejecimiento del vino para formar nuevos pigmentos poliméricos que resultan en la modificación del color del vino y una baja astringencia. Los flavanoles y antocianinas se encuentran principalmente en la piel y en las semillas de la uva, mientras que los flavonoles están presentes en la piel y en la pulpa de la uva roja y blanca [5,6].

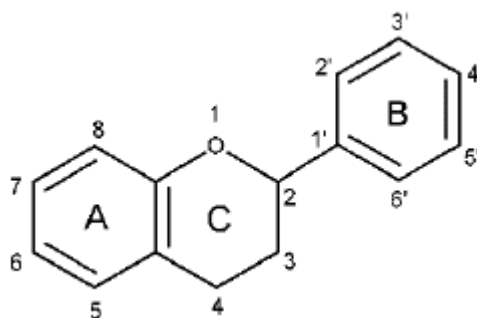


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides.

Los vinos canarios presentan unas características peculiares que los hacen distintivos al resto de vinos españoles, pues las Islas Canarias no es una región vitícola típica. En primer lugar, las uvas empleadas para la elaboración del vino, generalmente, son autóctonas en las que Listán Blanco y Listán Negro se emplean en mayor medida, aunque también se utilizan variedades de uva internacionales tales como Syrah, Merlot y Cabernet. Además, las vides jamás se han visto afectadas por la filoxera, por lo que el archipiélago se ha convertido en un patrimonio varietal de vid ya que se ha logrado mantener variedades que han estado presente durante siglos. Por otro lado, las Islas Canarias presentan un clima subtropical con veranos largos y calurosos e inviernos relativamente suaves con precipitaciones irregulares. Además, existen diferentes condiciones microclimáticas (humedad y temperatura) que van a depender en gran medida de la ubicación y la elevación. Por lo tanto, se pueden encontrar áreas verdes completamente fértiles con alta humedad y desiertos en el mismo archipiélago y, a veces, incluso en la misma isla. Generalmente, la mayoría de los viñedos son plantados en las laderas de las montañas donde la humedad creada por los vientos alisios modera el clima marítimo cálido. Por último, los suelos cultivables son de origen volcánico con diferentes edades geológicas y en distintos estados de evolución entre islas. Una composición de suelo diferente según la región considerada puede proporcionar diferentes notas minerales a los vinos producidos. Actualmente, las Islas Canarias cuentan con diez Denominaciones de Origen (D.O.) en las que se encuentran admitidas hasta un total de 30 variedades, siendo la isla de Tenerife el productor de vino más importante en el archipiélago [17-21].

Existen numerosos estudios en el que los polifenoles son considerados como nutrécicos debido a la posibilidad de prevenir enfermedades coronarias a largo plazo. Janice N. Averilla et al. demostraron que el extracto de orujo de uva se emplea para minimizar el riesgo de enfermedades nocivas [8]. Por otro lado, Sajid Maqsood et al. investigaron que la pasta de dátiles es un ingrediente alimentario funcional potencial para

desarrollar alimentos con beneficios prometedores para la salud [9]. Son altamente efectivos como defensa antioxidante ya que son capaces de neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS). Como consecuencia de su actividad antioxidante, los polifenoles poseen efectos vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios, pues han mostrado ser útiles para reducir la aterosclerosis inducida por fumar. Además, también son capaces de prevenir enfermedades como la diabetes, la hipertensión, la obesidad y la dislipidemia [2, 10].

Las condiciones ambientales (temperatura, humedad, latitud, etc) pueden afectar la maduración de la uva y en consecuencia la concentración de polifenoles [4], por lo que se ha podido establecer a este grupo de compuestos como marcadores taxonómicos [3]. Además, se ha comprobado que el contenido polifenólico de los vinos se encuentra influenciado por las condiciones de vinificación (prensado, tiempo de maceración, temperatura de vinificación, etc). Como los compuestos polifenólicos se encuentran predominantemente en las pieles y semillas de las uvas la extracción de los mismos durante la maceración en el mosto fermentado va a ser el paso más crítico en el proceso de la elaboración del vino [11].

El análisis de los compuestos polifenólicos supone un problema arduo debido a la complejidad de esta familia de compuestos. Los métodos que más se emplean hoy en día para su análisis se basan en técnicas separativas, entre las que destaca la extracción líquido-líquido, y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de Diodo Array (DAD) o detector de fluorescencia (FD) o la cromatografía de gases (GC) con derivatización y en especial la combinación de las técnicas cromatográficas antes mencionadas con un espectrómetro de masas (MS). Otras técnicas que se utilizan para el análisis y caracterización de los polifenoles son la espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis), resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) [5, 23, 24, 26, 28, 29]. El empleo de métodos estadísticos en combinación con el análisis de parámetros físico-químicos mediante métodos estandarizados, son la clave para diferenciar los vinos según su origen geográfico o para determinar la marca de calidad [5, 22-27].

El objetivo del presente trabajo se centra en la identificación y determinación del contenido polifenólico en diferentes tipos de vino con denominación de origen, procedentes de la Isla de Tenerife y la utilización de herramientas estadísticas en la

clasificación de los vinos estudiados en función del contenido polifenólico y su relación con el tipo de vino, denominación de origen y bodega de procedencia.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico), ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatéquico), ácido 4-hidroxibenzoico (ácido p-hidroxibenzoico), ácido 2,5-dihidroxibenzaldehído (DHB), ácido 3,4-dihidroxicinámico (ácido caféico), ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vanílico), ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico (ácido siríngico), (-)-epicatequina, ácido trans-4-hidroxicinámico (ácido p-cumárico), ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico (ácido ferúlico), ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinápico), ácido 2-hidroxibenzoico (ácido salicílico), ácido trans-4-hidroxi-3-metoxicinámico (trans-resveratrol), (+)-catequina, metanol calidad HPLC, ácido d-tartárico y ácido acético calidad HPLC. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Alemania).

El agua ultrapura (Milli-Q) obtenida mediante un sistema de purificación de agua Milli-Q A10 Millipore se utilizó para la preparación de las disoluciones.

2.2. Preparación de las disoluciones

2.2.1. Disoluciones individuales de compuestos polifenólicos

Se prepararon disoluciones patrón de ácido gálico, p-hidroxibenzoico, p-cumárico, epicatequina, ácido ferúlico y ácido caféico en metanol-agua (5:1). El resto se preparó utilizando agua Milli-Q. Las disoluciones se guardaron en la oscuridad. A partir de estas disoluciones se tomaron los volúmenes adecuados para la preparación de las disoluciones de trabajo.

2.2.2. Disolución madre de compuestos polifenólicos

Se pesaron las cantidades necesarias de cada compuesto disolviéndose posteriormente en metanol-agua (5:1), volumen total (V_T) 100 ml. Las concentraciones finales de cada polifenol se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Polifenoles y su concentración en la disolución madre.

Compuestos polifenólicos	Concentración (mg/L)
Ácido Gálico	350
Ácido Siríngico	450
(-)-Epicatequina	500
Ácido Ferúlico	60
Ácido Sinápico	90
Trans-Resveratrol	90
Ácido Protocatéquico	200
Ácido p-Hidroxibenzoico	250
Ác. Caféico + Ác. Vanílico	500
Ácido p-Cumárico	170
Ácido Salicílico	250
(+)-Catequina	650

2.2.3. Disolución del estándar interno

Se selecciona como estándar interno el ácido 2,5-dihidroxibenzaldehído (DHB) de concentración 100 mg/L.

2.2.4. Disolución de vino sintético

Disolución al 13% en etanol conteniendo 3 g/L de ácido tartárico.

2.2.5. Muestras de vino

Un total de 55 muestras de vinos obtenidas en diferentes bodegas con denominación de origen, localizadas en la isla de Tenerife. La distribución de vinos tintos, blancos y rosados en el total de las muestras se indica en la **Figura 3**.

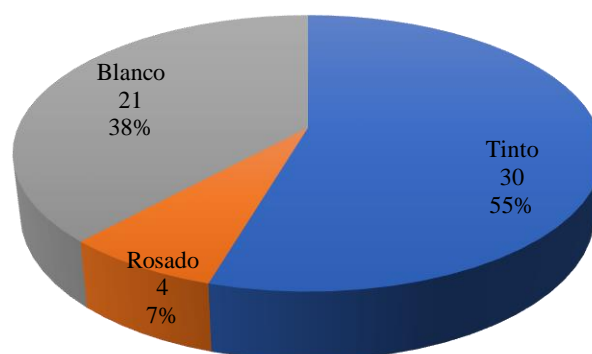


Figura 3. Tipos de vinos analizados con denominación de origen y procedencia la isla de Tenerife.

Método de análisis del vino: Para estudiar la composición polifenólica de los distintos vinos, se inyectó la muestra de vino tras la adición del patrón interno: 670 μL de la muestra y 330 μL de patrón interno (PI). Junto con las muestras, se inyectó varias veces el patrón de mayor concentración para ayudar en la identificación de los polifenoles.

2.3. Aparatos

- Sistema de filtración MILLIPORE a vacío para fases móviles de HPLC, empleando un filtro de 0,45 μm x 47 mm de Nylon 66. Supelco (Bellefonte, USA).
- Balanza analítica Sartorius modelo AW-224 de precisión 0,1 mg y capacidad máxima de pesada de 220g.
- pH-metro *FiveEasy Plus FEP20*, Mettler Toledo A.G., USA.
- Baño de ultrasonidos *Ultrasonic Cleaner*, Raypa de R. Espinar S.L., España.

2.4. Instrumentación

Cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) modular Varian Prostar (Palo Alto, California) equipado con:

- Inyector automático Varian 410 provisto de un loop de 100 μL .
- Juego de bombas Varian Prostar 210.
- Detector de Diodo Array Varian Prostar 330 (DAD).
- Detector de Fluorescencia Varian Prostar 363 (FD).
- Columna cromatográfica Varian Microsorb C18, 5 μm 250 x 4.6mm.

2.4.1. Condiciones cromatográficas

La composición de la fase móvil fue la siguiente: Fase móvil A: Metanol-Ácido Acético-Agua (10:2:88), Fase móvil B: Metanol-Ácido Acético-Agua (90:2:8).

Las fases móviles se filtraron y desgasificaron usando un baño de ultrasonidos durante 5 minutos.

La fase móvil se bombeó con un flujo de 1 mL/min con el siguiente programa gradiente de composición (A:B) (**Tabla 2**). El tiempo de análisis de los cromatogramas tuvo una duración de 70 min y 4 minutos de estabilización.

Tabla 2. Condiciones de gradiente y composición de la fase móvil.

Tiempo (min)	%A	%B
0	100	0
25	85	15
45	50	50
55	42	58
70	42	58
72	100	0
74	100	0

2.5. Software

- Programa Microsoft® Office 2016 (Word, Excel y PowerPoint).
- Varian Star Chromatography ver. 6.41.
- Base de datos Mendeleev (Editorial Elsevier®).
- Programa estadístico IBM SPSS Statistics 25.

2.6. Análisis estadístico

La matriz de datos está formada por el contenido de los polifenoles estudiados en los diferentes tipos de vino. Se realizó un análisis univariado de parámetros básicos, detección de valores anómalos, e histogramas de frecuencia, un análisis bivariado de comparación de medias y correlaciones simples y un análisis multivariado de correlaciones múltiples, componentes principales, análisis discriminante lineal y análisis de clúster.

3. Resultados y discusión

3.1. Identificación de los polifenoles

Una vez fijadas las condiciones óptimas para el análisis cromatográfico HPLC-DDA y HPLC-DF, **Tabla 3**, se identificó cada uno de los compuestos en función de su tiempo de retención y su espectro Vis-UV.

Tabla 3. Tiempos de retención y longitudes de onda características para cada analito.

Compuestos Polifenólicos	Long. Onda (nm)	Tiempo de retención (t_R) (min)
Ácido Gálico	281,8	4,7
Ácido Protocatéquico	257,5	8,2
(+)-Catequina	(Em = 256 nm, Ex = 338 nm) (DF)	13,2
Ácido p-Hidroxibenzoico	254,1	13,3
DHB (Patrón Interno)	366,1	16,2
Ác. Caféico + Ác. Vanílico	325,0	19,5
Ácido Siríngico	273,4	22,4
(-)-Epicatequina	276,0	23,5
Ácido p-Cumárico	309,0	29,7
Ácido Ferúlico	320,6	33,8
Ácido Sinápico	321,6	35,3
Ácido Salicílico	299,8	36,2
Trans-Resveratrol	317,4	42,3

Debido a las proximidades de algunos tiempos de retención y longitudes de onda fue necesario utilizar dos canales de detección en el detector DDA (Vis-UV) y un tercero para el DF (**Tabla 4**) con lo cual se generan tres cromatogramas por cada inyección. Por otro lado, no fue posible separar las señales del ácido caféico y del ácido vanílico, expresándose como suma (caféico + vanílico).

Tabla 4. Condiciones de trabajo y programación de los dos canales de detección por DDA.

Canal 1 (PDA)		Canal 2 (PDA)	
Tiempo (min)	Long. Onda (nm)	Tiempo (min)	Long. Onda (nm)
0	280	0	257
8	366	7	254
15	274	15	325
28	320	24	309
36	317	28	300

En las **Figuras 4-6** se muestran como ejemplo los cromatogramas obtenidos con cada uno de los canales de Vis-UV y fluorescencia (FL).

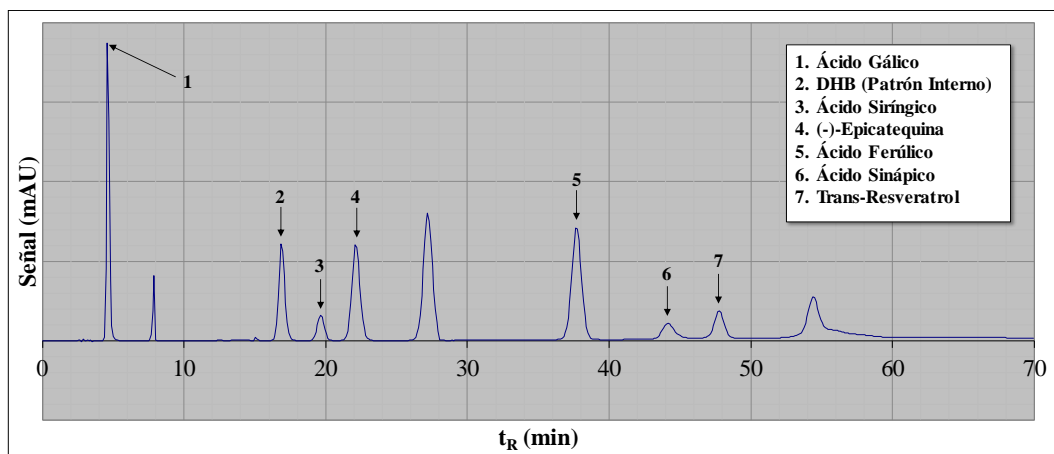


Figura 4. Cromatograma de la disolución patrón de mayor concentración obtenido con detector de DDA en las condiciones de trabajo optimizadas (canal 1).

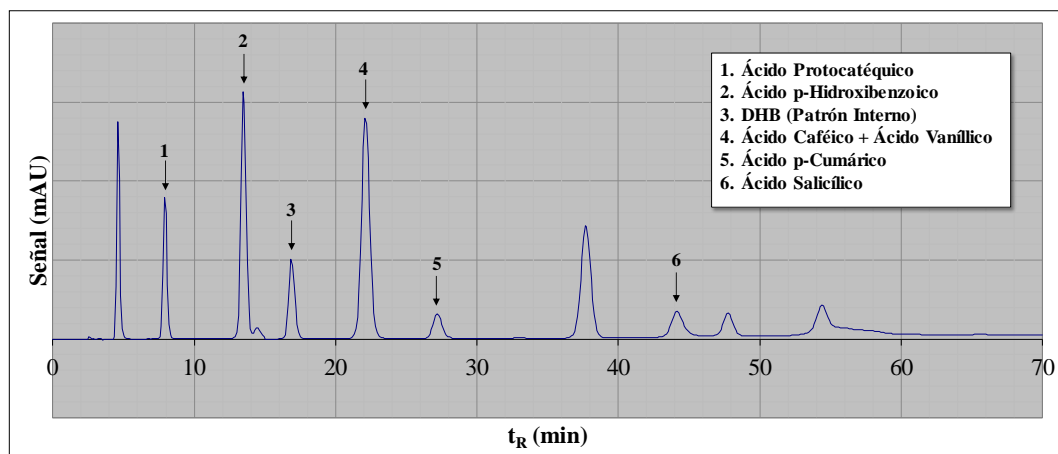


Figura 5. Cromatograma de la disolución patrón de mayor concentración obtenido con detector de DDA en las condiciones de trabajo optimizadas (canal 2).

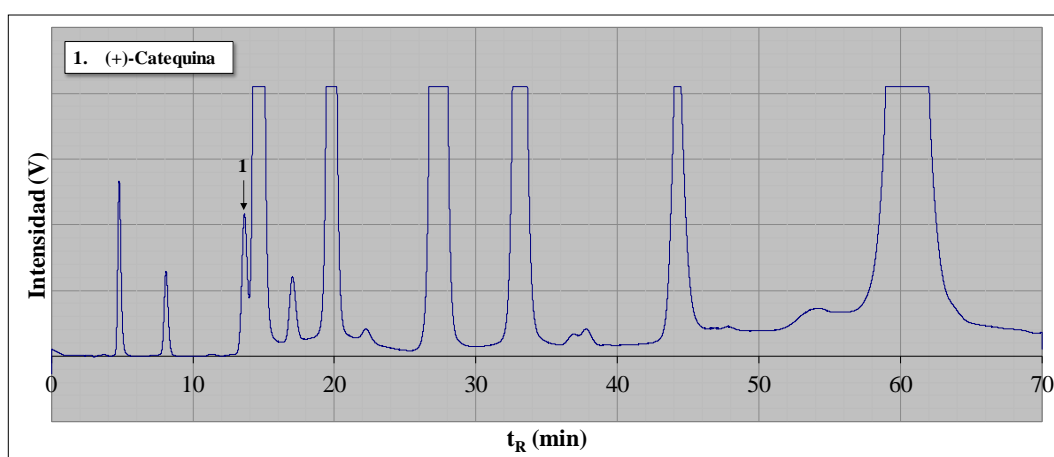


Figura 6. Cromatograma de la disolución patrón de mayor concentración obtenido con DF en las condiciones de trabajo optimizadas.

3.2. Efecto matriz sobre los tiempos de retención de los polifenoles

Las muestras de vino se consideran muestras muy complejas. Tras un primer análisis de los vinos se observó un desplazamiento en los tiempos de retención característicos de algunos polifenoles. Esto hace sospechar que la inyección directa del vino provoque una sobrecarga de matriz orgánica en la columna que ocasiona este fenómeno. Por ello, se efectuó un estudio para confirmar si la matriz del vino influye en los tiempos de retención de los diferentes polifenoles. Se prepararon sucesivas diluciones de vinos de cada tipo (blanco, rosado y tinto) a los cuales se le añadió una cantidad constante de disolución madre (50 μ L) para asegurar una correcta identificación. A continuación, se realizó una comparación con los tiempos de retención obtenidos al inyectar un patrón de polifenoles (50 μ L de disolución madre en agua). Los resultados se recogen en las **Figura 7**.

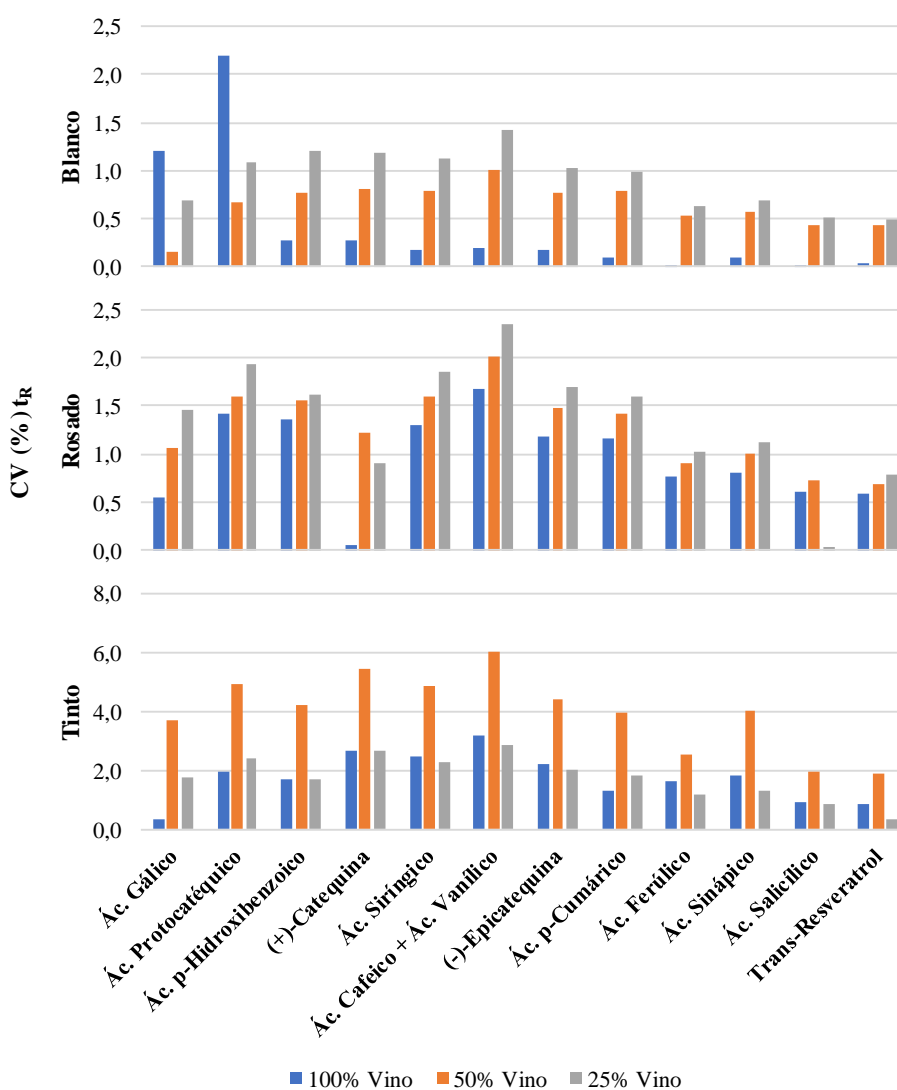


Figura 7. Coeficientes de variación obtenidos con respecto al tiempo de retención de los diferentes polifenoles añadidos a los vinos.

En los vinos blancos y rosados la mayor parte de las desviaciones en los t_R se producen en las inyecciones con mayor dilución (25%), o sea, aquellas que contienen menos materia orgánica, al contrario de lo que cabría esperar. En las muestras de vino tinto las mayores desviaciones en los t_R se producen para la dilución intermedia (50%). De forma general, se observa que hay diferencias en los t_R entre las diferentes diluciones de vino. Esto indica un efecto de la cantidad de materia orgánica contenida en la muestra sobre los tiempos de retención, aunque la tendencia no es constante para todos los compuestos ni para todos los vinos.

Esto obligó a revisar de forma manual todos los cromatogramas para corregir el desplazamiento en los tiempos de retención, asegurando así una correcta identificación.

3.3. *Curva de calibrado*

El estudio del calibrado se realizó inyectando diluciones de la disolución madre de compuestos polifenólicos en vino sintético con la adición de patrón interno. El rango de concentraciones y los parámetros de calidad del método analítico se indican en la **Tabla 5**.

3.4. *Repetibilidad y reproducibilidad*

Estudio de Repetibilidad (Precisión Inter-día): se inyectaron disoluciones de la disolución patrón de la recta de calibrado más concentrada, cuatro veces durante tres días consecutivos. Con los 12 cromatogramas obtenidos se calculó para cada polifenol la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas de pico cromatográfico (**Tabla 6**).

Estudio de Reproducibilidad (Precisión Intra-día): Se realizaron cinco inyecciones para un mismo nivel de concentración y se calculó para cada polifenol la desviación estándar relativa (RSD) de las áreas de pico cromatográfico (**Tabla 6**).

Los resultados obtenidos de las RSD correspondientes a las áreas de pico de cada analito para ambos estudios es inferior al 12%, por lo que la precisión se considera aceptable tanto en términos de repetibilidad como de reproducibilidad.

Tabla 5. Resumen de los parámetros del calibrado y de calidad analítica obtenidos por HPLC-DDA y DF para la mezcla de compuestos polifenólicos.

Calibración interna										
Compuesto polifenólico	R²	S_{y/x}	Ordenada origen	S_{x.o}	Pendiente	S_{pendiente}	[LOD]* mg/L	[LOQ]* mg/L	[LOL] mg/L	Rango Trabajo mg/L
Ácido Gálico	0,9948	3,55E-02	6,60E-03	2,35E-02	3,69E-02	1,20E-03	0,068	0,228	35,00	1,75-35,00
Ácido Siríngico	0,9950	4,85E-02	1,54E-02	3,21E-02	4,03E-02	1,27E-03	0,155	0,515	45,00	2,25-45,00
(-)-Epicatequina	0,9954	1,06E-02	1,67E-03	7,03E-03	8,25E-03	2,51E-04	0,798	2,659	50,00	2,50-50,00
Ácido Ferúlico	0,9986	6,72E-03	7,08E-02	4,95E-03	7,17E-02	6,82E-03	0,059	0,196	6,00	0,30-6,00
Ácido Sinápico	0,9953	1,90E-02	2,04E-02	1,37E-02	1,05E-01	3,61E-03	0,054	0,181	6,75	0,45-6,75
Trans-Resveratrol	0,9966	1,99E-02	-5,28E-03	1,32E-02	1,00E-01	2,61E-03	0,036	0,122	9,00	0,45-9,00
Ácido Protocatéquico	0,9952	3,74E-02	1,13E-03	2,86E-02	5,71E-02	2,28E-03	0,070	0,233	20,00	1,00-20,00
Ácido p-Hidroxibenzoico	0,9964	6,17E-02	2,92E-02	4,08E-02	1,09E-01	2,91E-03	0,046	0,154	25,00	1,25-25,00
Ác. Caféico + Ác. Vanílico	0,9957	8,95E-02	3,52E-02	5,93E-02	7,16E-02	2,11E-03	0,093	0,309	50,00	2,50-50,00
Ácido p-Cumárico	0,9981	3,04E-02	-1,48E-02	2,19E-02	1,39E-01	3,06E-03	0,052	0,174	12,75	0,85-12,75
Ácido Salicílico	0,9962	2,23E-02	-5,35E-03	1,60E-02	4,90E-02	1,52E-03	0,159	0,530	18,75	1,25-18,75
(+)-Catequina	0,9965	1,04E-01	-2,18E-03	7,45E-02	9,17E-02	2,72E-03	0,017	0,057	48,75	3,25-48,75

*Calculados utilizando la relación señal/ruido (S/N). LOD: 3S/N, LOQ: 10S/N. R² Coeficiente de Determinación.

Tabla 6. Estudio de repetibilidad (Reproducibilidad Inter-día) y reproducibilidad (Reproducibilidad Intra-día) para las áreas de cada uno de los compuestos polifenólicos (RSD: desviación estándar relativa).

	Reproducibilidad	
	Intra-día (%)	Inter-día (%)
Ácido Gálico	0,23	0,72
Ácido Protocatéquico	1,13	1,77
(+)-Catequina	3,73	3,61
Ácido p-Hidroxibenzoico	1,00	2,52
DHB (Patrón Interno)	2,66	5,16
Ác. Caféico + Ác. Vanílico	0,41	2,39
Ácido Siríngico	0,42	1,22
(-)-Epicatequina	0,52	1,54
Ácido p-Cumárico	0,91	5,45
Ácido Ferúlico	1,75	2,79
Ácido Sinápico	4,91	6,66
Ácido Salicílico	2,09	3,96
Trans-Resveratrol	0,87	6,64

3.5. Determinación del contenido polifenólico en muestras de vino.

La **Tabla 7** muestra los contenidos medios de cada polifenol según el tipo de vino expresados como media \pm S_{x_0} (desviación típica del método) [12]. Se observa como los analitos ácido gálico, (+)-catequina y (-)-epicatequina presentan valores medios bastante más altos en los vinos tintos en comparación con su contenido en vinos blancos y rosados. Por el contrario, el ácido p-hidroxibenzoico está presente en muy baja concentración en todas las muestras de vinos estudiadas.

Tabla 7. Concentraciones medias de polifenoles presentes en las muestras de vino expresadas como media \pm S_{x0}.

Compuestos polifenólicos	Vino Tinto	Vino Rosado	Vino Blanco
Ácido Gálico	27,92 \pm 1,64	11,03 \pm 1,77	6,47 \pm 1,48
Ácido Protocatéquico	24,26 \pm 2,94	18,78 \pm 2,66	22,07 \pm 2,65
Ácido p-Hidroxibenzoico	0,81 \pm 1,04	0,85 \pm 1,27	0,67 \pm 1,06
(+)-Catequina	12,41 \pm 1,93	6,20 \pm 2,81	6,16 \pm 2,30
Ácido Siríntrico	4,28 \pm 2,02	0,36 \pm 2,75	5,01 \pm 2,02
Ácido Caféico + Vaníllico	8,48 \pm 1,91	6,92 \pm 2,56	7,11 \pm 2,02
(-)-Epicatequina	52,36 \pm 3,01	13,10 \pm 2,43	18,26 \pm 1,68
Ácido p-Cumárico	1,06 \pm 0,46	2,26 \pm 0,52	2,77 \pm 0,40
Ácido Ferúlico	5,48 \pm 0,21	0,65 \pm 0,24	4,84 \pm 0,19
Ácido Sinápico	1,26 \pm 0,33	0,42 \pm 0,47	0,40 \pm 0,40
Ácido Salicílico	6,93 \pm 0,71	9,43 \pm 0,98	15,23 \pm 1,00
Trans-Resveratrol	7,94 \pm 0,38	1,04 \pm 0,41	4,92 \pm 0,26

El tipo de polifenoles presente en cada tipo de vino presenta diferencias. La **Figura 8** muestra como sólo el ácido gálico aparece en el 100% de los vinos, seguido del ácido protocatéquico, ácido caféico + ácido vaníllico y (+)-catequina. Por el contrario, el ácido sinápico se presenta en un porcentaje bajo, encontrándose en un 40% de los vinos tintos, 25% de los vinos rosados y solamente en el 19% de los vinos blancos. La (-)-epicatequina, ácido ferúlico y ácido salicílico están presentes en todas las muestras de vino rosado, lo que contrasta con el hecho de su baja concentración o no detección en los vinos tintos y blancos. Sin embargo, el escaso número de muestras de vinos rosados con respecto al resto hace que estos resultados deban ser tomados con cautela.

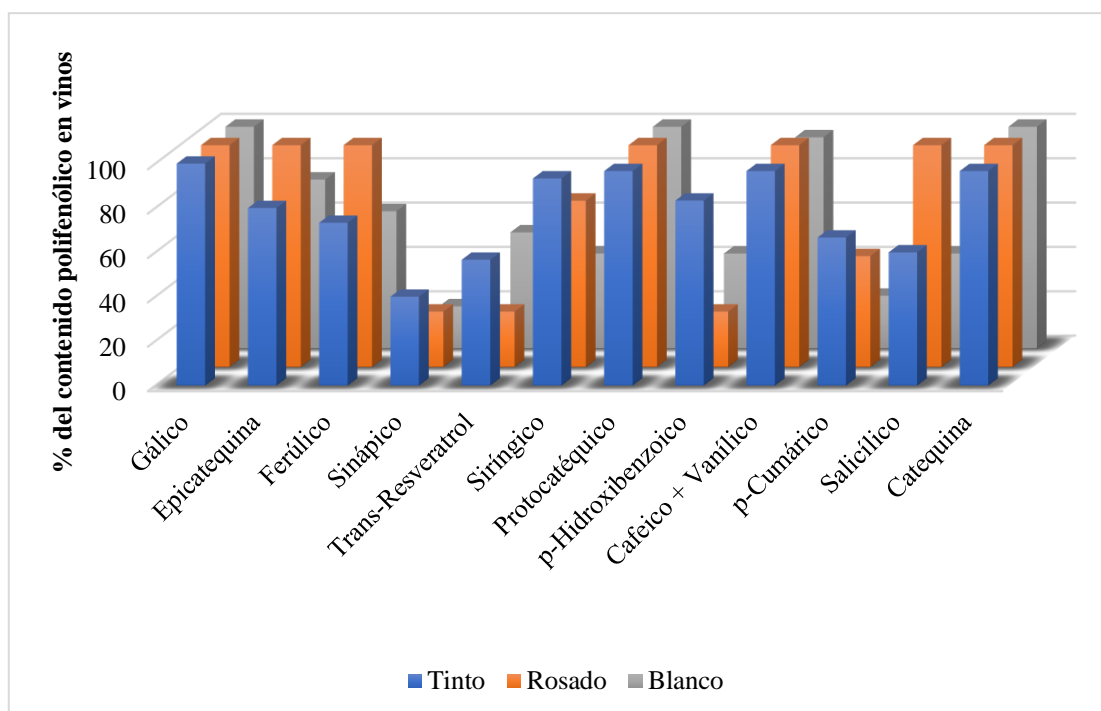


Figura 8. Presencia de los polifenoles estudiados expresada como porcentaje.

En la **Tabla 8**, se recogen los resultados de varios autores sobre el contenido de los polifenoles individuales encontrados en vinos. El mayor contenido de polifenoles se encontró en los vinos tintos. El ácido gálico es el ácido hidroxibenzoico más concentrado en los vinos canarios seguido de la mezcla ácido caféico + ácido vanílico. En los vinos blancos los compuestos predominantes son la mezcla de ácido caféico y de ácido vanílico. También se encontraron buenos niveles de ácido gálico, ácido p-cumárico y ácido ferúlico. Estos resultados muestran una variación en el contenido fenólico entre las muestras de vino, pues su heterogeneidad es debido a diversos factores tales como las condiciones climáticas locales y las técnicas de vinificación.

Tabla 8. Resultados comparativos del contenido polifenólico (mg/L) entre diferentes autores (nd: no detectado).

	Vinos Tintos			Vinos Rosados			Vinos Blancos	
	(n = 55)*	(n = 250) [30]	(n = 55) [31]	(n = 55)*	(n = 2) [32]	(n = 1) [32]	(n = 55)*	(n = 6) [32]
Ác. Gálico	27,9 ± 1,6	41,8 ± 24,0	21,1 ± 11,5	11,0 ± 1,8	361,9 ± 8,9	86,7 ± 1,7	6,5 ± 1,5	20,5 ± 0,3
Ác. Siríntrico	4,3 ± 2,0	7,9 ± 2,8	2,0 ± 0,8	0,4 ± 2,8	27,0 ± 0,9	5,5 ± 0,1	5,0 ± 2,0	2,7 ± 0,1
(+)-Catequina	12,4 ± 1,9	85,9 ± 29,9	20,2 ± 8,5	6,2 ± 2,8	nd	nd	6,2 ± 2,3	nd
Ác. Protocatéuico	24,3 ± 2,9	nd	nd	18,8 ± 2,7	nd	nd	22,1 ± 2,7	92,3 ± 1,8
Ác. Caféico + Ác. Vanílicio	8,5 ± 1,9	nd	nd	6,9 ± 2,6	91,8 ± 3,2	13,5 ± 0,5	7,1 ± 2,0	24,4 ± 0,4
(-)-Epicatequina	52,4 ± 3,0	nd	nd	13,1 ± 2,4	85,57 ± 2,58	20,6 ± 1,7	18,3 ± 1,7	nd
Ác. p-Cumárico	1,1 ± 0,5	nd	nd	2,3 ± 0,5	67,1 ± 2,6	11,6 ± 0,2	2,8 ± 0,4	15,0 ± 0,1
Ác. Ferúlico	5,5 ± 0,2	nd	nd	0,7 ± 0,2	2,6 ± 0,1	nd	4,8 ± 0,2	5,3 ± 0,1
Trans-resveratrol	7,9 ± 0,4	nd	nd	1,0 ± 0,4	17,1 ± 0,1	7,28 ± 0,04	4,9 ± 0,3	3,64 ± 0,06

*Valores de este estudio

3.6. *Análisis Exploratorio de los Perfiles Polifenólicos presentes en los vinos*

La **Tabla 9** presenta un resumen del estudio estadístico descriptivo para los diferentes polifenoles considerando la totalidad de las muestras. En ella se aprecian valores máximos de 149 mg/L para la (-)-epicatequina, 52,7 mg/L para el ácido gálico, 50 mg/L para ácido caféico + ácido vanílico y 48 mg/L para el ácido protocatéquico. En la **Tabla 9** también se recogen los valores de la asimetría y curtosis que, de forma general, se alejan de los valores 0 y 3, respectivamente.

Uno de los requisitos necesarios para la aplicación de diferentes herramientas estadísticas en el análisis exploratorio de los datos es comprobar el comportamiento normal de los datos. Los gráficos de caja y bigote (box-and-whisker) permiten una primera aproximación al comportamiento de los polifenoles en la que se manifiesta la presencia de datos anómalos o outliers marcados con asterisco en las **Figuras 9-20**. Tanto los histogramas de frecuencias como los diagramas de box-and-whisker indican que las muestras no se ajustan a una distribución normal en cuanto a su contenido en polifenoles. Por ello es necesario emplear herramientas de la estadística no paramétrica para el análisis de los datos.

Tabla 9. Resumen de los parámetros estadísticos básicos para los polifenoles presentes en las muestras de vino (n=55).

	N	Valor Mínimo	Valor Máximo	Media	Desviación Estándar	Asimetría	Curtosis
Ácido Gálico	55	0,17	52,71	18,50	12,98	0,36	-0,45
(-)-Epicatequina	44	3,59	149,65	36,39	34,31	1,48	1,78
Ácido Ferúlico	39	0,14	17,09	4,77	4,82	1,19	0,52
Ácido Sinápico	17	0,11	4,83	1,01	1,13	2,78	8,56
Ácido Sirínico	40	0,17	14,47	4,15	3,71	1,33	1,34
Ácido p-Hidroxibenzoico	35	0,07	2,48	0,78	0,70	0,88	-0,41
Ác. Cafeico + Ác. Vanílico	53	0,33	50,98	7,84	9,70	2,22	6,48
Ácido p-Cumárico	27	0,23	10,41	1,47	2,02	3,70	15,64
Ácido Salicílico	31	0,61	40,01	9,67	8,81	1,58	3,44
(+)-Catequina	54	2,12	25,83	9,52	5,89	1,01	0,72
Ácido Protocatéquico	54	1,85	48,06	23,08	11,23	0,28	0,01
Trans-Resveratrol	29	0,23	18,65	6,56	5,43	0,49	-0,87

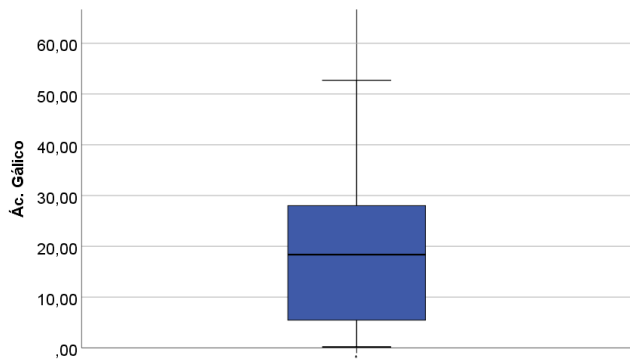


Figura 9. Diagrama de Box-Whisker del ácido gálico.

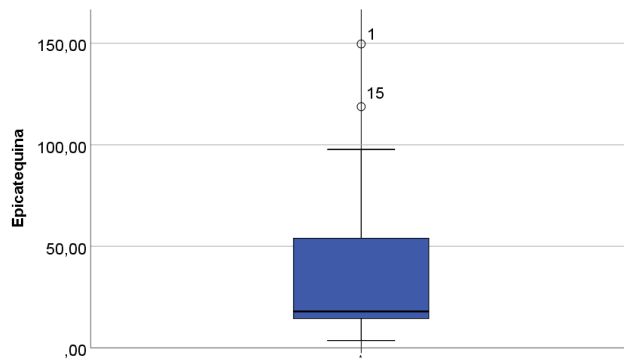


Figura 10. Diagrama de Box-Whisker de la (-)-epicatequina.

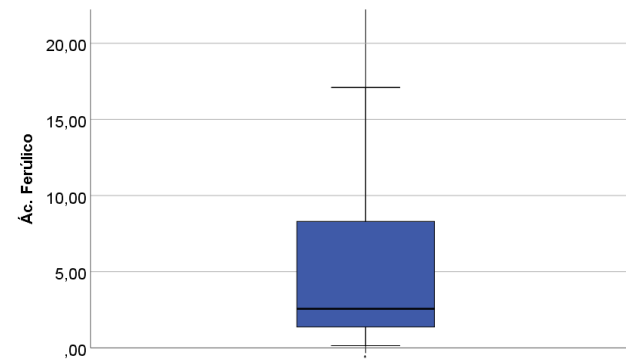


Figura 11. Diagrama de Box-Whisker del ácido ferúlico.

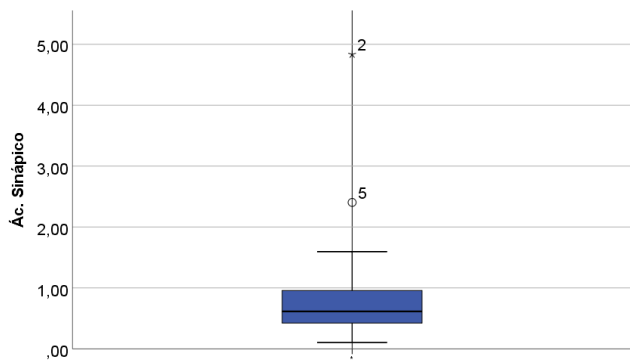


Figura 12. Diagrama de Box-Whisker del ácido sinápico.

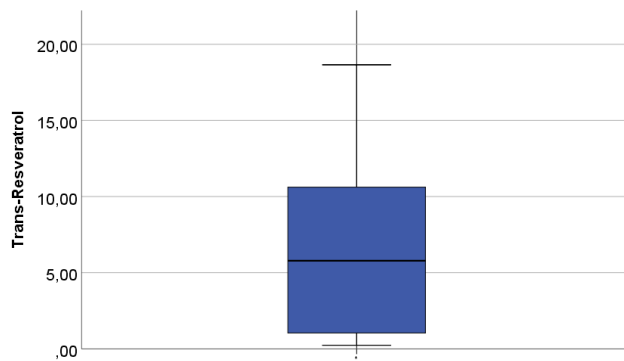


Figura 13. Diagrama de Box-Whisker del ácido trans-resveratrol.

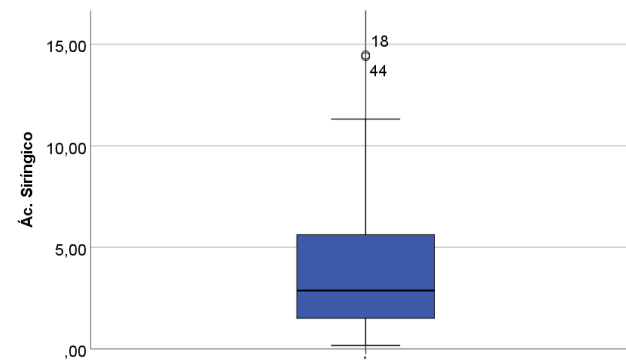


Figura 14. Diagrama de Box-Whisker del ácido siríngico.

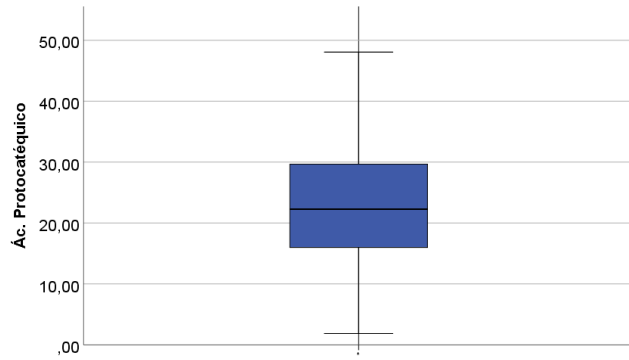


Figura 15. Diagrama de Box-Whisker del ácido protocatéquico.

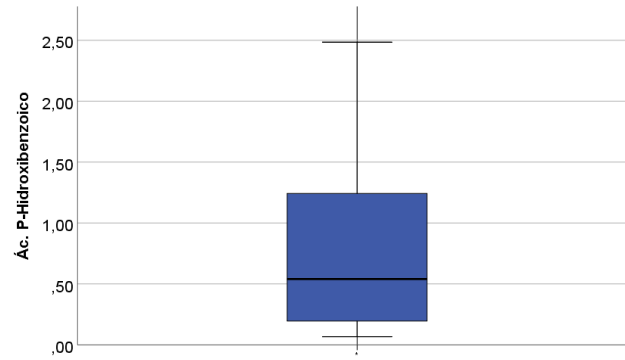


Figura 16. Diagrama de Box-Whisker del ácido p-hidroxiibenzoico.

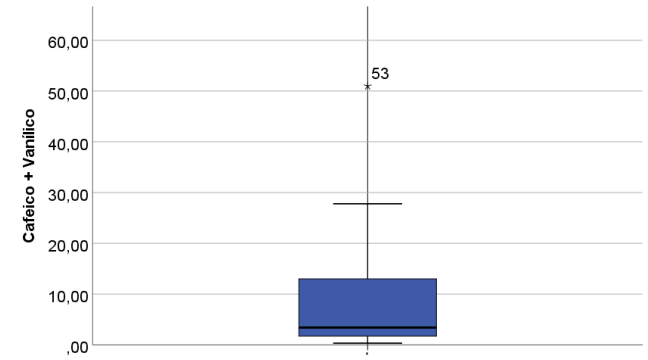


Figura 17. Diagrama de Box-Whisker del ácido caféico + ácido vanílico.

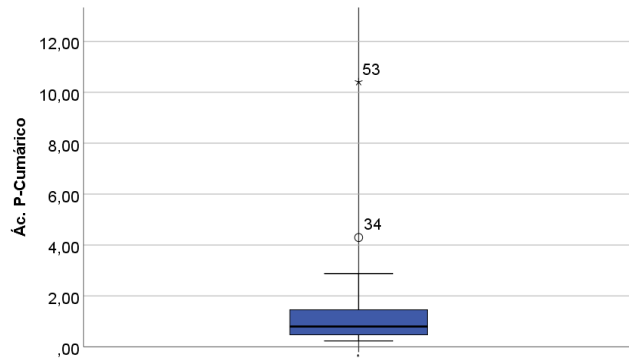


Figura 18. Diagrama de Box-Whisker del ácido p-cumárico.

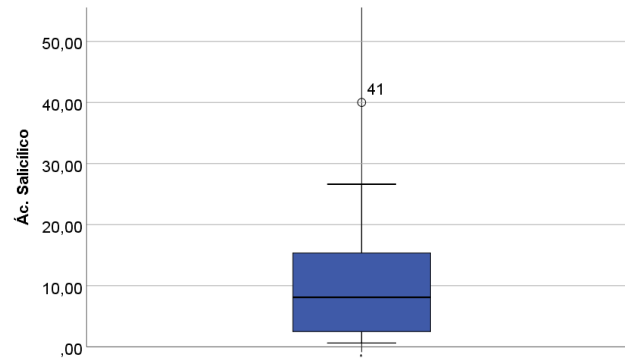


Figura 19. Diagrama de Box-Whisker del ácido salicílico.

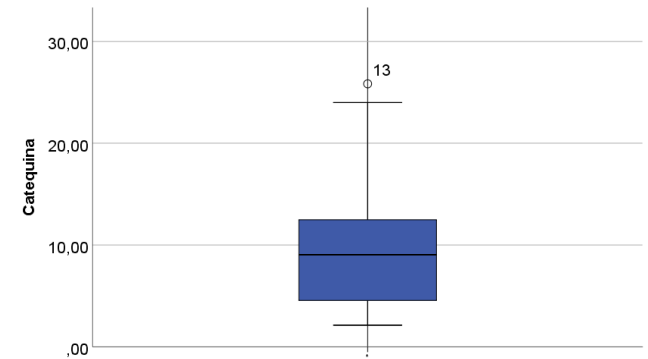


Figura 20. Diagrama de Box-Whisker de la (+)-catequina.

El análisis ANOVA utilizando el método de Tukey, y la prueba post hoc de Bonferroni indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los vinos tintos y vinos blancos, y vinos tintos y vinos rosados, con $p < 0.05$ con respecto a la concentración del ácido gálico, y la (+)-catequina. Mientras que para la (-)-epicatequina existen diferencias estadísticamente significativas entre los vinos tintos y vinos blancos, pero no entre los vinos rosados con respecto a vinos blancos y vinos tintos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el contenido del resto de polifenoles con respecto al tipo de vino, **Tabla 10**.

Los resultados obtenidos por el método Tukey y el de Bonferroni fueron equivalentes por lo que se omitieron los resultados de este último.

Tabla 10. Subconjuntos homogéneos de polifenoles con medias estadísticamente significativas obtenidos aplicando la prueba HSD de Tukey.

Compuesto polifenólico	Tipo Vino	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Gálico	Blanco	21	6,473	-
	Rosado	4	11,030	-
	Tinto	30	-	27,919
	Sig.		0,434	1,000
Epicatequina	Blanco	16	18,263	18,263
	Rosado	4	13,098	-
	Tinto	24	-	52,363
	Sig.		0,934	0,062
Catequina	Blanco	21	6,164	-
	Rosado	4	6,197	-
	Tinto	29	-	12,407
	Sig.		1,000	1,000

El estudio de correlaciones permite estudiar las relaciones entre los polifenoles presentes en las muestras de vino. Inicialmente se estudiaron las correlaciones bivariadas sin distinguir entre tipos de vinos, seleccionando aquellas con $p < 0.05$ y $R > 5,0$. Posteriormente, se representó en un diagrama de dispersión simple aquellos polifenoles que podrían tener una correlación entre las concentraciones y confirmar si siguen una tendencia (**Figuras 21-29**).

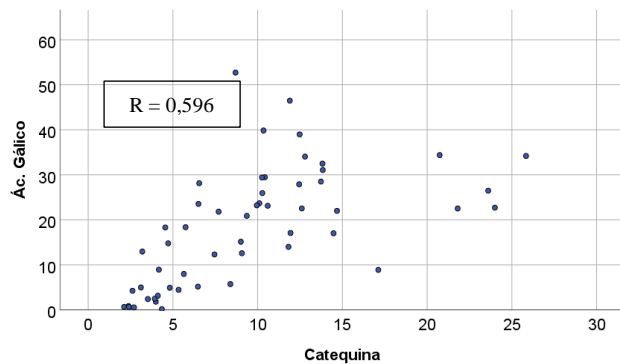


Figura 21. Contenido de dispersión de ácido gálico vs. (+)-catequina.

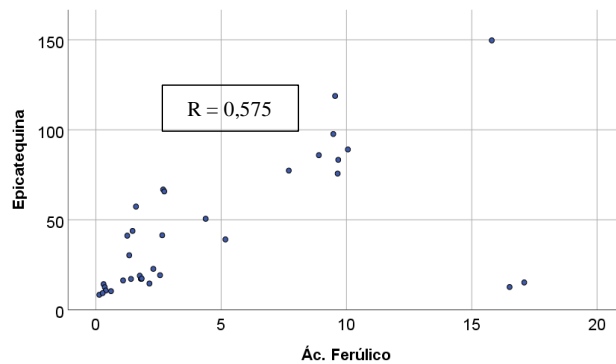


Figura 22. Contenido de dispersión de (-)-epicatequina vs. ácido ferúlico.

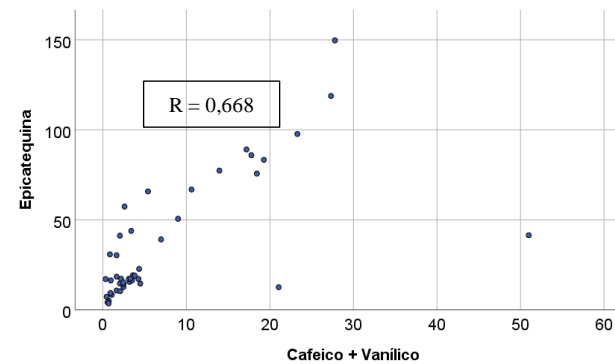


Figura 23. Contenido de dispersión de (-)-epicatequina vs. ácido cafeico + ácido vanílico.

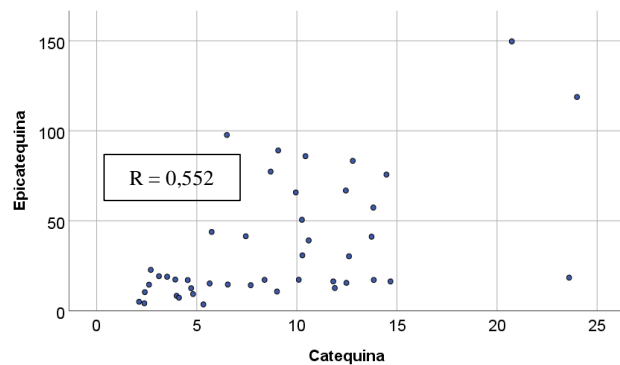


Figura 24. Contenido de dispersión de (-)-epicatequina vs. (+)-catequina.

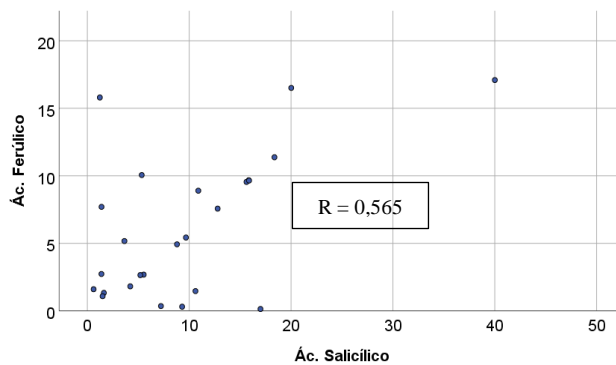


Figura 25. Contenido de dispersión de ácido ferúlico vs. ácido salicílico.

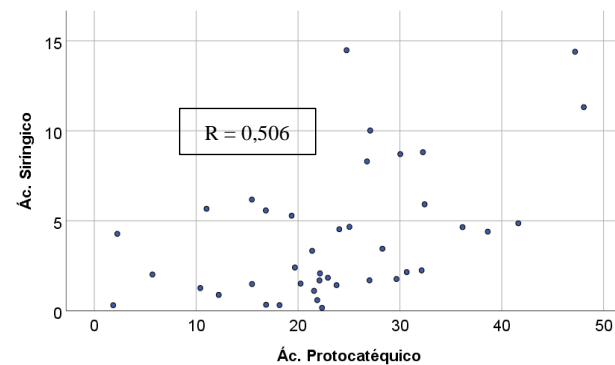


Figura 26. Contenido de dispersión de ácido siríngico vs. ácido protocátéquico.

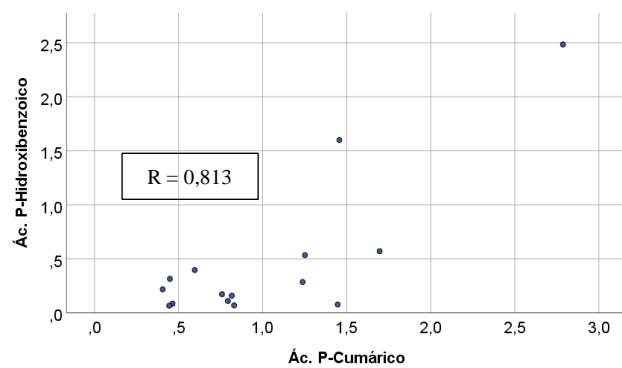


Figura 27. Contenido de dispersión de ácido p-hidroxibenzoico vs. ácido p-cumárico.

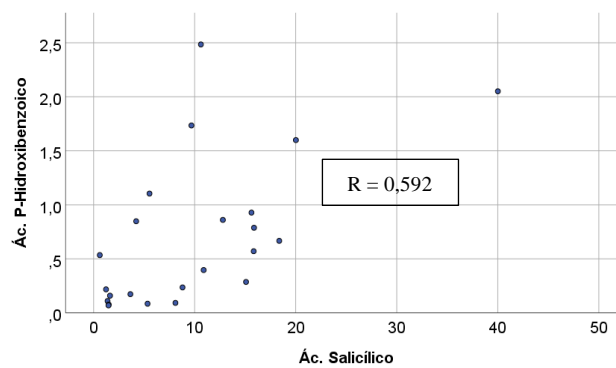


Figura 28. Contenido de dispersión de ácido p-hidroxibenzoico vs. ácido salicílico.

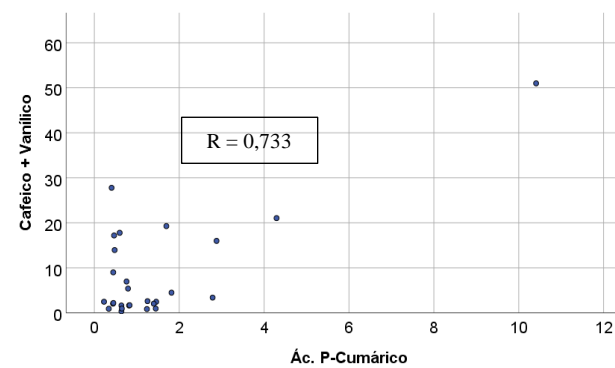


Figura 29. Contenido de dispersión de ácido caféico + vanílico vs. ácido p-cumárico.

La regresión múltiple permite estudiar si existen relaciones entre contenidos de varios polifenoles. En la **Tabla 11** se resume los resultados de las principales correlaciones múltiples y los coeficientes de determinación correspondientes. Como se puede apreciar todos los coeficientes son superiores a 0,6 lo cual indica un buen ajuste del modelo matemático.

Tabla 11. Estudio de regresión múltiple (R^2 coeficiente de determinación).

Expresión matemática	R^2
$[\text{catequina}] = 0,323 \cdot [\text{ác. gálico}] + 0,082 \cdot [\text{epicatequina}] + 0,103 \cdot [\text{trans-resveratrol}] + 0,362$	0,750
$[\text{p-cumárico}] = -0,130 \cdot [\text{ác. protocatéquico}] + 0,475 \cdot [\text{p-hidroxibenzoico}] + 0,394$	0,611
$[\text{epicatequina}] = 0,209 \cdot [\text{ác. ferúlico}] + 0,462 \cdot [\text{caféico} + \text{vanílicico}] + 0,538 \cdot [\text{catequina}] + 0,480$	0,724
$[\text{ác. p-hidroxibenzoico}] = 0,817 \cdot [\text{ác. p-cumárico}] + 0,125 \cdot [\text{ác. salicílico}] - 0,194$	0,650

La búsqueda de una posible relación entre tipo de vino, variedad de uva, bodegas, denominación de origen necesita de una selección de aquellas variables más importantes en este sistema de estudio para que el conjunto de datos sea manejable. Para ello, se utilizó la técnica de análisis de componentes principales (CPA) con el objetivo de reducir el número de variables. La aplicación de esta metodología encuentra una limitación cuando existe un número de valores perdidos (huecos) elevado. Por ello se recurrió a la técnica propuesta por Paul A. Succop et al. [13-16] en la que proponen la sustitución de los valores por debajo del límite de detección por el valor de $LOD/\sqrt{2}$. Sin embargo, no se recomienda que el número de sustituciones superen el 10% de los datos ya que se modificaría sustancialmente los valores de la media y la desviación estándar, entre otros. Por tanto, finalmente se seleccionaron las variables ácido protocatéquico, ácido gálico, (+)-catequina y ácido caféico + ácido vanílicico.

Realizando un CPA se obtiene que existen dos componentes principales que explican el 74,0% de la varianza total. El peso de las variables en cada componente principal, así como el porcentaje de varianza explicada se recoge en la **Tabla 12**. La variable con mayor peso en el primer componente principal es el ácido gálico y en el segundo la suma de ácido caféico + ácido vanílicico, seleccionándose estas variables como representantes de cada uno de ellos.

Tabla 12. Matriz de pesos de las diferentes variables en los dos primeros componentes principales (CP 1: componente principal 1, CP 2: componente principal 2).

	CP 1	CP 2
Ác. Gálico	0,741	0,257
Ác. Caféico + Vanílico	0,161	0,898
(+)-catequina	0,863	0,194
Ác. Protocatéquico	0,728	-0,451
% Varianza explicada	46,23	27,84

Una vez seleccionadas las variables, se procedió a aplicar un análisis discriminante lineal y un análisis de clúster como métodos de clasificación tutorizado y no tutorizado respectivamente para estudiar la existencia de posibles agrupamientos entre muestras, considerando los tipos de vino, bodegas, zona de la isla, tipo de uva, etc.

Los resultados de la clasificación utilizando el ADL (**Tabla 13**) indica que un 72% de las muestras se clasificaron correctamente. Correspondiendo a un 80% de los vinos tintos y el 76,2% de los vinos blancos. Sin embargo, no se clasifican correctamente los vinos rosados. Esto puede ser debido por una parte a la pequeña cantidad de muestras de vinos rosados frente a las de vinos tintos o blancos y por otro lado a los diferentes procedimientos de vinificación que existen para los vinos rosados que los convierte en un grupo muy heterogéneo. Esto indica que las variables seleccionadas para este análisis aportan información características distintivas para los vinos blancos y vinos tintos.

Tabla 13. Resultados de la clasificación del análisis discriminante.

	Tipo Vino	Pertenencia a grupos pronosticada		
		Tinto	Rosado	Blanco
	Tinto	80,0	0,0	20,0
%	Rosado	50,0	0,0	50,0
	Blanco	23,8	0,0	76,2

Un análisis pormenorizado de la gráfica de ADL (**Figura 30**) muestra tendencias de agrupamiento entre los vinos blancos y tintos. En la **Figura 30** se refleja de forma gráfica los agrupamientos comentados en la tabla anterior.

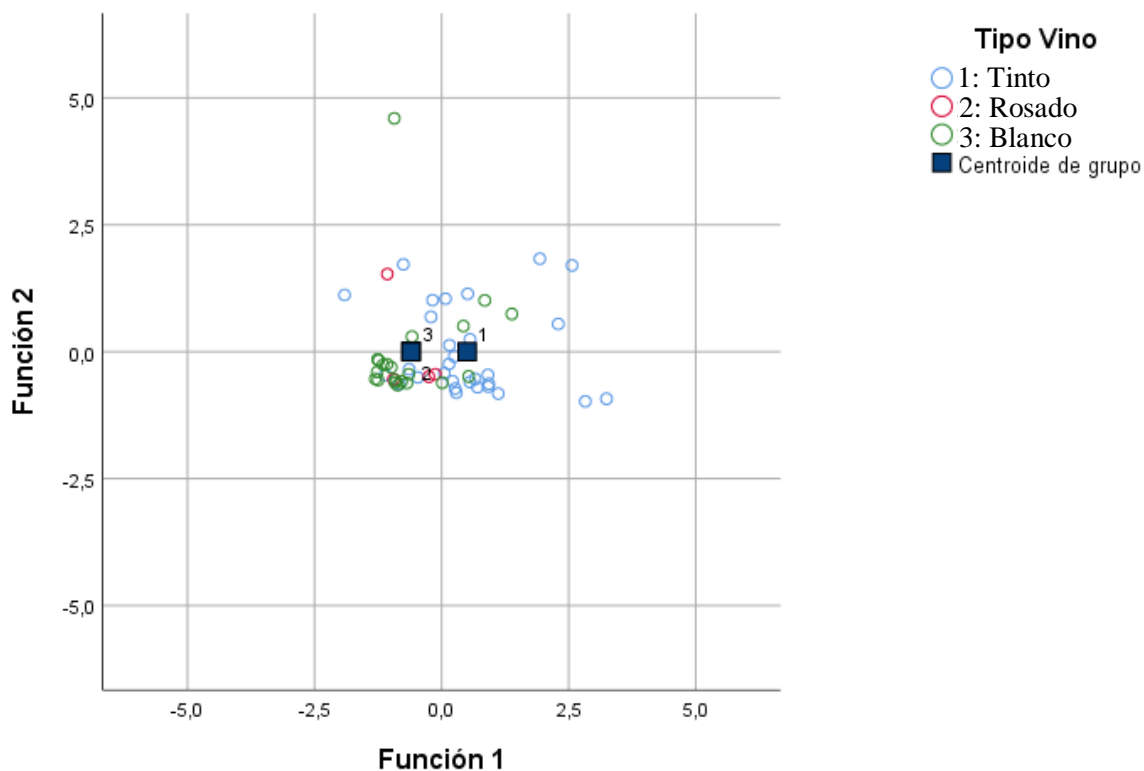


Figura 30. Análisis discriminante del contenido de polifenoles en función del tipo de vino.

En el análisis de clúster las muestras se agrupan de acuerdo con la distancia euclídea entre los puntos generados por las variables en el espacio muestral. Los resultados se presentan en forma de dendograma donde la clasificación de los vinos (**Figura 31**) muestra dos grupos importantes. En el primero hay una mayor prevalencia de vinos blancos, mientras que los vinos tintos están situados preferentemente fuera de este primer grupo de muestras y aparecen mezclados con los vinos rosados lo cual parece indicar una conclusión similar a la encontrada con el Análisis Discriminante Lineal.

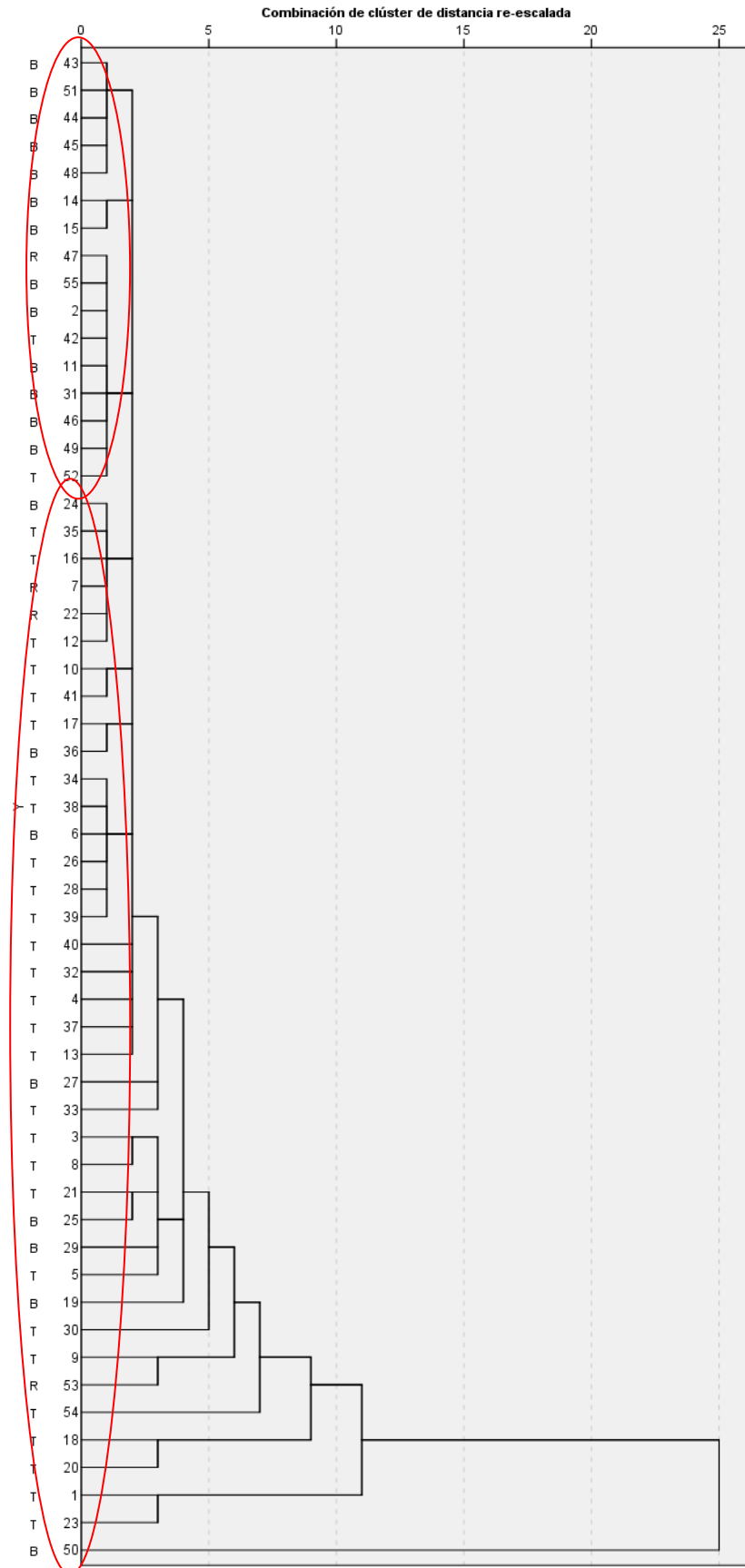


Figura 31. Análisis de clúster, dendrograma que utiliza un enlace único (B: vino blanco, R: vino rosado, T: vino tinto).

4. Conclusiones

1. Se utilizaron dos canales de detección PDA diferentes para la detección y cuantificación de los polifenoles.
2. Para la detección y cuantificación de la (+)-catequina se empleó el detector de fluorescencia.
3. No fue posible separar las señales debidas al ácido caféico y vanílico por lo que se determinó la señal como ácido caféico + ácido vanílico.
4. Los resultados obtenidos de las RSD correspondientes a las áreas de pico de cada analito en el estudio de la precisión Intra-día e Inter-día son inferiores al 12%, una adecuada repetibilidad y reproducibilidad instrumental del método cromatográfico.
5. El método ya optimizado se aplicó a 55 muestras de diferentes tipos de vino con denominación de origen.
6. El estudio del efecto matriz repercute directamente sobre la reproducibilidad de los tiempos de retención de los polifenoles, pero no en las áreas de pico.
7. Se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de las concentraciones del ácido gálico, (+)-catequina y (-)-epicatequina contenidos en los vinos tintos con respecto a sus contenidos medios presentes en vinos rosados y vinos blancos.
8. Existen correlaciones significativas, tanto simples como múltiples, en las concentraciones de ácido gálico vs. (+)-catequina, (-)-epicatequina vs. ácido ferúlico, (-)-epicatequina vs. ácido caféico + ácido vanílico, (-)-epicatequina vs. (+)-catequina, ácido ferúlico vs. ácido salicílico, ácido siríngico vs. ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico vs. ácido p-cumárico, ácido p-hidroxibenzoico vs. ácido salicílico y ácido caféico + ácido vanílico vs. ácido p-cumárico.
9. Se logró realizar una clasificación de las muestras considerando el tipo de vino con un 72,7% de acierto, pero no se consiguió agrupar según bodegas, variedades de uva y denominación de origen por ninguno de los dos tipos de análisis.

5. Bibliografía

- [1] González, I. N., Periago, M. J., & Alonso, F. J. G. (2017). Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 21(4), 320–326. <https://doi.org/10.14306/renhyd.21.4.357>.
- [2] Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Sharopov, F., Docea, A. O., Karaca, A. C., Sharifi-Rad, M., Kanncaoglu, D.K., Gülseren, G., Senol, E., Demircan, E., Taheri, Y., Rasul Suleria, H.A., Özçelik, B., Kasapoglu, K.N., Gültekin-Özgülven, M., Daskaya-Dikmen, C., Cho, W.C., Martins, N., & Calina, D. (2020). Diet, lifestyle and cardiovascular diseases: Linking pathophysiology to cardioprotective effects of natural bioactive compounds. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17). <https://doi.org/10.3390/ijerph17072326>.
- [3] Niculescu, V-C., Paun, N., Ionete, R. E. (2017). The evolution of polyphenols from grapes to wines. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72800>.
- [4] Brighenti, E., Casagrande, K., Cardoso, P. Z., Pasa, M. da S., Ciotta, M. N., & Brighenti, A. F. (2017). Total polyphenols contents in different grapevine varieties in highlands of southern brazil. *BIO Web of Conferences*, 9, 01024. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170901024>.
- [5] Palade, L., & Popa, M. (2018). Polyphenol Fingerprinting Approaches in Wine Traceability and Authenticity: Assessment and Implications of Red Wines. *Beverages*, 4(4), 75. <https://doi.org/10.3390/beverages4040075>.
- [6] Fuente, L. (2014). Estudio de la capacidad antioxidante de los polifenoles del vino y sus aplicaciones.
- [7] Oliver, R. (2010). Análisis de polifenoles en los vinos mediante técnicas de separación.
- [8] Averilla, J. N., Oh, J., Kim, H. J., Kim, J. S., & Kim, J. S. (2019). Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Science and Biotechnology*, 28(6), 1607–1615. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00628-2>.

- [9] Maqsood, S., Adiamo, O., Ahmad, M., & Mudgil, P. (2020). Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. *Food Chemistry*, 308, 125522. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125522>.
- [10] Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria: Órgano Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>.
- [11] Unterkofler, J., Muhlack, R. A., & Jeffery, D. W. (2020). Processes and purposes of extraction of grape components during winemaking: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4737–4755. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10558-3>.
- [12] Miller, J.N., & Miller, J.C. *Estadística y Quimiometría Para Química Analítica*, Pearson Educación, S.A., Madrid (2002).
- [13] Succop, P. A., Clark, S., Chen, M., & Galke, W. (2004). Imputation of data values that are less than a detection limit. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 1(7), 436–441. <https://doi.org/10.1080/15459620490462797>.
- [14] Madley-Dowd, P., Hughes, R., Tilling, K., & Heron, J. (2019). The proportion of missing data should not be used to guide decisions on multiple imputation. *Journal of Clinical Epidemiology*, 110, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2019.02.016>.
- [15] Dong, Y., & Peng, C. Y. J. (2013). Principled missing data methods for researchers. *SpringerPlus*, 2(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-222>.
- [16] Knottnerus, J. A., & Tugwell, P. (2019). Inadequate comparators produce misleading results – the importance of good comparison practice. *Journal of Clinical Epidemiology*, 110, v–vi. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2019.04.010>.
- [17] Moreno, I. M., Gutiérrez, A. J., Rubio, C., González, A. G., Gonzalez-Weller, D., Bencharki, N., Hardisson, A., & Revert, C. (2018). Classification of Spanish red wines using artificial neural networks with enological parameters and mineral content.

American Journal of Enology and Viticulture, 69(2), 167–175.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2017.17021>.

[18] Darias-Martín, J. J., Andrés-Lacueva, C., Díaz-Romero, C., & Lamuela-Raventós, R. M. (2008). Phenolic profile in varietal white wines made in the Canary Islands. *European Food Research and Technology*, 226(4), 871–876.
<https://doi.org/10.1007/s00217-007-0609-9>.

[19] González, S.S., González, O., Barreno, J.J., González, F., & Rodríguez-Torres, I. (2012). Caracterización agronómica y potencial enológico de siete variedades minoritarias de vid en Canarias. *Revista “Enólogos.”*

[20] Heras-Roger, J., Díaz-Romero, C., Darias-Martín, J., & Rios-Mesa, D. (2018). Characterization of Red Wines from Macaronesia. *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.71795>.

[21] Díaz, C., Conde, J. E., Claverie, C., Díaz, E., & Pérez Trujillo, J. P. (2003). Conventional enological parameters of bottled wines from the Canary Islands (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/S0889-1575\(02\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0889-1575(02)00134-5).

[22] Díaz, C., Conde, J. E., Méndez, J. J., & Trujillo, J. P. P. (2002). Chemometric studies of bottled wines with denomination of origin from the Canary Islands (Spain). *European Food Research and Technology*, 215(1), 83–90. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0495-0>.

[23] Sádecká, J., & Jakubíková, M. (2020). Varietal classification of white wines by fluorescence spectroscopy. *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), 2545–2553.
<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04291-y>.

[24] Izquierdo-Llopart, A., & Saurina, J. (2019). Characterization of sparkling wines according to polyphenolic profiles obtained by HPLC-UV/Vis and principal component analysis. *Foods*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/foods8010022>.

- [25] Sridhar, K., & Charles, A. L. (2018). Application of multivariate statistical techniques to assess the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of commercial grape cultivars. *Journal of Chemometrics*, 32(12), 1–13. <https://doi.org/10.1002/cem.3073>.
- [26] Larrauri, A., Núñez, O., Hernández-Cassou, S., & Saurina, J. (2017). Determination of polyphenols in white wines by liquid chromatography: Application to the characterization of Alella (Catalonia, Spain) wines using chemometric methods. *Journal of AOAC International*, 100(2), 323–329. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0407>.
- [27] Díaz, C., Conde, J. E., Estévez, D., Pérez Olivero, S. J., & Pérez Trujillo, J. P. (2003). Application of multivariate analysis and artificial neural networks for the differentiation of red wines from the Canary Islands according to the island of origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4303–4307. <https://doi.org/10.1021/jf0343581>.
- [28] Tzima, K., Brunton, N. P., & Rai, D. K. (2018). Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in lamiaceae plants—a review. *Plants*, 7(2), 1–30. <https://doi.org/10.3390/plants7020025>.
- [29] Ramawat, K. G., & Mérillon, J. M. (2013). Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6>.
- [30] Heras-Roger, J., Díaz-Romero, C., & Darias-Martín, J. (2016). A comprehensive study of red wine properties according to variety. *Food Chemistry*, 196, 1224–1231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.085>.
- [31] Rodríguez-Delgado, M. A., González, G., Pérez-Trujillo, J. P., & García-Montelongo, F. J. (2002). Trans-resveratrol in wines from the Canary Islands (Spain). Analysis by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 76(3), 371–375. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00258-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00258-8).
- [32] Paixão, N., Pereira, V., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2008). Quantification of polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC.

Journal of Separation Science, 31(12), 2189–2198.

<https://doi.org/10.1002/jssc.200800021>.