

Proyecto “Garnachas Históricas: Grupo de cooperación para la conservación de garnachas históricas de la Denominación de Origen Protegida Campo de Borja”.

Informe de justificación técnica Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE).

Periodo de justificación : hasta agosto de 2023.

Actividad 1: “Verificar la especificidad del aroma potencial de la uva de los viñedos históricos”.

Definición del trabajo:

Según lo establecido en el proyecto de colaboración, el LAAE participa en el desarrollo de la Actividad 1 y en ese marco, se establece que recibirá las muestras de mostos enriquecidos en alcohol (mistelas) de los viñedos históricos y de sus viñedos equivalentes edafo-climáticos. Sobre esas muestras, realizará las tareas de generación, aislamiento, identificación y cuantificación de los aromas presentes en dichos mostos bajo forma de precursores.

Los datos serán tratados e interpretados en términos de potencia, intensidad y diversidad aromática.

El trabajo concluirá con la realización de un informe sobre los aspectos más relevantes en relación con el proyecto.

Tareas realizadas durante el HIT01:

Tal y como se indicó en el Informe del HIT01, durante esa primera etapa de trabajo se procedió en el LAAE a la preparación del laboratorio y a la recepción de las muestras (en forma de uvas) elegidas por la D.O. Campo de Borja.

Además, se comenzó la primera parte del tratamiento de las uvas de acuerdo con el protocolo de trabajo establecido en el LAAE [1], hasta la obtención de lo que se denominan “mistelas” de uvas.

Retomamos la descripción de actividades a partir de este punto.

[1] Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P., Ferreira, V. *Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs)*. Food Research International. 127 (2020) 108728. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108728.

Tareas realizadas durante el HITO2:

Muestras.

Adjunto se presenta en forma de tabla un resumen de las muestras analizadas y sus características.

Tabla1. Muestras CRDO Campo de Borja.

CODIGO UVAS LAAE	muestra CODIGO CRDO CampoBorja	descripción	CODIGO MUESTRAS LAAE	INFORMACIÓN CRDO CampoBorja											GRADO brix a la recepción de muestra
				Provincia	Municipio	Variedad	Año	Edad	Superficie	Marv	Marv	V/E	S/R	fecha vendimia	
B2	50-006-046-064-T	Testigo	T_Ainzón	50-ZARAGOZA	006-Ainzón	GARNACHA TINTA	2016	6	3,6873	3	1,5	V	S	21/09/2022	28,4
B1	50-006-045-120-H	Histórica	H_Ainzón	50-ZARAGOZA	006-Ainzón	GARNACHA TINTA	1980	42	1,6298	2,1	2,1	V	S	12/09/2022	27,0
B3	50-154-024-078-T	Testigo	T_Magalón	50-ZARAGOZA	154-Magalón	GARNACHA TINTA	2011	11	0,8021	3	1,2	E	R	19/09/2022	29,4
B4	50-154-024-078-H	Histórica	H_Magalón	50-ZARAGOZA	154-Magalón	GARNACHA TINTA	1940	82	0,3559	2,1	2,1	V	S	19/09/2022	29,6
B6	50-114-018-183-T	Testigo	T_Fuendejalón	50-ZARAGOZA	114-Fuendejalón	GARNACHA TINTA	2013	9	1,1428	3,2	1,4	E	S	21/09/2022	29,6
B5	50-114-018-058-H	Histórica	H_Fuendejalón	50-ZARAGOZA	114-Fuendejalón	GARNACHA TINTA	1975	47	0,4362	2	2	V	S	21/09/2022	27,6
B7	50-114-035-150-T	Testigo	T_Pozuelo	50-ZARAGOZA	114-Fuendejalón (Pozuelo)	GARNACHA TINTA	2017	5	0,5835	3,2	1,5	E	S	27/09/2022	26,2
B8	50-114-002-201-H	Histórica	H_Pozuelo	50-ZARAGOZA	114-Fuendejalón (Pozuelo)	GARNACHA TINTA	1990	32	1,0236	2,1	2,1	V	S	27/09/2022	28,6
B10	50-055-042-162-T	Testigo	T_Borja	50-ZARAGOZA	55-BORJA	GARNACHA TINTA	2016	6	1,0594	3	1	E	S	04/10/2022	26,6
B9	50-055-041-006-H	Histórica	H_Borja	50-ZARAGOZA	55-BORJA	GARNACHA TINTA	1970	52	2,0398	2	2	V	S	04/10/2022	29,2
B11	50-252-035-122-T	Testigo	T_Tabuenca	50-ZARAGOZA	252-TABUENCA	GARNACHA TINTA	2019	3	2,1725	3	1,5	E	S	04/10/2022	25,4
B12	50-252-035-170-H	Histórica	H_Tabuenca	50-ZARAGOZA	252-TABUENCA	GARNACHA TINTA	1980	42	0,9101	2,1	2,1	V	S	04/10/2022	28,2

Tratamiento de las muestras.

Partiendo de las “mistelas” ya obtenidas en el HITO1, el desarrollo del trabajo con las muestras fue el siguiente:

1. Extracción de las fracciones polifenólicas y precursoras de aromas (FFA's).
2. Reconstitución en medio hidroalcohólico e hidrólisis por calentamiento en anoxia de las FFA's para analizar el potencial aromático que pueden desarrollar, propiciando la generación de los aromas presentes en estas muestras bajo forma de precursores.

Preparación de las fracciones polifenólicas y precursoras de aromas (FFA's)

Se prepararon las correspondientes FFA's siguiendo el protocolo de establecido en el LAAE [1] y que se presenta de forma gráfica en la Figura 1.

En este proceso, las mistelas se centrifugan en frío y se desalcoholizan en un rotavapor hasta un volumen final determinado (Figura 1A). Posteriormente se percolan por un cartucho Sep Pack C18 10 g (Waters, Irlanda) previamente acondicionado (Figura 2B) y una vez percoladas, tras un lavado con agua mili-Q a pH 3,5 para eliminar los azúcares, aminoácidos e iones, se secan los cartuchos con el paso de aire a vacío con ayuda de un sistema de extracción SPE. Se

recuperan las fracciones polifenólicas y precursoras de aromas (FFA's) por elución con 100 mL de etanol absoluto (Figura 1C). Las FFA's resultantes se almacenan en el congelador para su uso posterior.

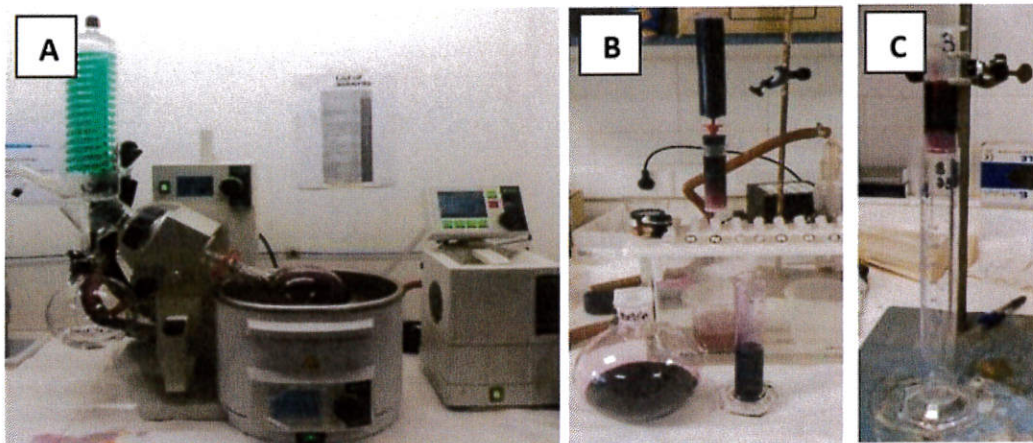


Figura 1: **A)** Mistela centrifugada en el rotavapor. **B)** Mistela desalcoholizada percolando por el cartucho Sep Pack C18. **C)** Elución de las fracciones fenólicas y aromáticas con etanol absoluto.

Reconstitución e hidrólisis de las FFA's

Para la preparación final de las muestras se procede a la reconstitución de las FFA's extraídas de mistelas en vino sintético; para ello, se añade a un vino sintético con 5 g/L de ácido tartárico y pH 3,5 el 13,3% (v/v) de FFA (correspondiente a 13,3%(v/v) de etanol).

Una vez obtenidas las FFA's reconstituidas se procede a su hidrólisis para la generación de los aromas presentes bajo forma de precursores.

Para ello se prepararon en viales y embolsaron en anoxia, alícuotas de cada una de las muestras y se sometieron al proceso de hidrólisis almacenándose en una a estufa a 75 °C durante un tiempo determinado:

- Una parte durante 24 horas (para analizar el potencial aromático que presentaban de terpenos, norisoprenoides, vainillina y derivados, fenoles y otros)
- y otra parte a 96 horas para evaluar los tioles varietales.

Determinaciones realizadas y resultados.

Una vez terminados los procesos de hidrólisis se procedió al análisis de las mismas. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

Se siguieron los protocolos establecidos en el LAEE para la determinación de compuestos traza (mayoritariamente terpenos, norisoprenoides y fenoles) - Oliveira et al., [2] - en el primer set de muestras y tioles varietales – basado en Vichi et al., [3] – en el segundo set.

Los resultados se presentan a continuación en forma de tablas (**Tabla2 y Tabla3**).

[2] Oliveira, I.; Ferreira, V. *Modulating Fermentative, Varietal and Aging Aromas of Wine Using Non-Saccharomyces Yeasts in a Sequential Inoculation Approach*. Microorganisms 2019, 7 (6), 164.
DOI: 10.3390/microorganisms7060164.

[3] Vichi, S.; Cortés-Francisco, N.; Caixach, J. *Analysis of Volatile Thiols in Alcoholic Beverages by Simultaneous Derivatization/Extraction and Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry*. Food Chem. 2015, 175, 401–408.
DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.095.

Tabla2. Contenido en volátiles trazas (expresados en ug/l, excepto los indicados como áreas relativas).

	CODIGO LAAE	R-limonene	1,8-Cineole	Unalol oxide (isomers juntos)	Dihydro myrcenol	Vitispirane A and 8 (area relativa)	Unalol	Rising Acetal (area relativa)	α-Terpinol	TDN	l-Citronellol	l-Denatonone	l-Phenethyl acetate	Geraniol	Guaiacol	l-limonene	o-Cresol	g-Nonalactone	m-Cresol	4-Vinylguaiacol	Massala lactone	Syringal	trans-bougeinol	4-Vinylphenol	Methoxy eugenol	Vanillin	Acetovanillone	Syring aldehyde
	T T Almon	8,49	0,81	1,40	1,83	11,05	4,14	3,14	3,07	4,33	0,46	1,70	2,34	0,70	3,34	0,24	0,35	0,59	8,04	46,46	<0,1	58,26	0,11	45,49	0,49	70,66	19,73	1776,38
	T T Almon	7,54	0,74	1,41	1,66	11,25	3,93	3,15	3,05	4,41	0,41	1,67	2,29	0,66	3,41	0,22	0,36	0,53	8,06	45,80	<0,1	58,03	0,11	47,46	0,51	72,83	19,94	1890,62
	H H Almon	9,14	1,08	1,62	2,22	13,93	5,65	3,65	6,55	4,96	0,58	1,57	2,44	1,06	4,20	0,27	0,26	0,79	8,74	44,25	<0,1	58,38	0,19	65,61	0,61	56,99	13,69	793,02
	H H Almon	10,72	0,93	1,54	1,86	13,89	5,25	3,66	6,57	4,72	0,47	1,56	2,70	0,97	3,98	0,23	0,25	0,70	8,09	41,08	<0,1	54,60	0,18	64,27	0,49	53,82	13,21	726,41
	T T Magalón	8,53	0,81	1,16	1,66	17,05	2,97	4,22	4,11	5,85	0,53	2,03	2,95	0,58	2,22	0,24	0,21	1,24	6,63	34,20	0,92	58,40	0,13	51,86	0,35	64,76	10,82	1465,34
	T T Magalón	9,36	0,86	1,21	1,70	18,86	3,10	4,31	4,10	6,22	0,55	2,11	2,79	0,54	2,22	0,25	0,21	1,21	6,63	33,26	0,95	56,77	0,12	52,02	0,35	62,12	10,39	1383,50
	H H Magalón	5,69	0,56	1,49	1,32	25,28	3,62	5,92	2,47	7,67	0,40	2,65	3,33	0,71	4,19	0,19	0,18	1,39	5,52	45,83	1,40	75,60	0,13	64,88	0,79	112,38	16,12	2624,30
	H H Magalón	5,30	0,63	1,48	1,48	26,15	3,89	5,98	2,50	8,11	0,42	2,65	3,39	0,69	4,26	0,21	0,19	1,38	5,80	45,17	1,43	74,89	0,15	64,71	0,79	110,89	16,07	2629,89
	T T FuenteSagún	7,71	0,80	1,51	1,70	20,81	3,25	4,87	3,00	6,99	0,47	1,75	2,22	0,54	3,93	0,22	0,32	0,92	4,84	39,25	1,09	70,85	0,14	46,61	0,37	70,02	14,02	1766,11
	T T FuenteSagún	7,72	0,75	1,54	1,71	21,19	3,27	4,88	3,01	7,07	0,50	1,78	2,34	0,55	3,88	0,21	0,31	0,97	4,74	39,98	1,12	71,40	0,13	47,81	0,35	72,48	14,24	1791,89
	H H FuenteSagún	8,54	1,08	1,04	2,09	8,74	4,21	2,80	4,64	3,37	0,55	1,31	1,75	0,77	4,33	0,29	0,41	0,76	7,25	41,15	0,70	48,04	0,09	39,55	0,43	57,74	18,12	1194,51
	H H FuenteSagún	8,64	1,11	1,02	2,10	8,67	4,25	2,59	4,66	3,42	0,55	1,29	1,84	0,75	4,22	0,28	0,42	0,78	7,28	41,41	0,68	47,22	0,10	38,45	0,43	57,76	17,31	1134,41
	T T Pouelo	6,12	0,81	1,11	1,62	22,88	2,85	5,16	2,49	7,85	0,34	2,06	2,90	0,49	2,02	0,22	0,10	0,57	5,83	44,70	1,14	78,83	0,11	85,51	0,42	57,25	9,23	1394,68
	T T Pouelo	5,41	0,70	1,13	1,33	23,07	2,66	5,26	2,47	8,36	0,28	2,17	3,15	0,50	2,03	0,18	0,09	0,57	5,25	44,13	0,97	82,39	0,10	82,06	0,44	57,74	9,55	1322,24
	H H Pouelo	5,16	0,68	1,62	1,18	22,25	3,23	6,04	2,35	8,71	0,42	2,32	3,47	0,63	4,41	0,21	0,28	1,11	10,00	73,13	<0,1	93,78	0,14	157,80	0,88	89,60	22,25	1991,80
	H H Pouelo	4,56	0,63	1,59	1,05	22,09	2,94	5,94	2,27	8,94	0,38	2,31	3,07	0,59	4,42	0,19	0,27	1,06	9,67	69,68	<0,1	94,78	0,12	155,30	0,90	93,00	22,77	2076,60
	T T Borja	4,09	0,49	1,52	1,15	15,65	4,03	4,42	3,32	6,96	0,30	2,75	3,71	0,84	1,99	0,14	0,21	0,44	6,23	39,33	<0,1	64,56	0,12	44,21	0,53	63,38	14,28	2233,49
	T T Borja	4,40	0,56	1,54	1,19	16,06	4,01	4,11	3,36	7,27	0,31	2,73	3,67	0,85	2,04	0,15	0,21	0,42	6,45	38,58	<0,1	63,00	0,13	44,69	0,47	60,29	14,07	2416,41
	H H Borja	4,60	0,50	1,41	0,77	14,80	2,01	3,41	2,21	4,64	0,25	0,98	1,44	0,39	3,63	0,12	0,42	0,60	14,69	56,68	<0,1	58,67	0,13	85,57	0,47	58,64	11,00	568,71
	H H Borja	4,27	0,50	1,38	0,86	13,96	2,08	3,15	2,20	4,30	0,26	0,93	1,37	0,37	3,50	0,12	0,42	0,54	14,22	53,40	<0,1	54,84	0,13	82,67	0,42	54,80	10,14	511,23
	T Tabuenca	4,41	0,54	1,83	0,89	20,21	7,29	5,85	5,60	8,26	0,31	2,25	2,90	1,44	1,87	0,13	0,12	0,37	4,39	45,99	<0,1	68,68	0,12	69,34	0,43	44,14	14,46	1093,26
	T Tabuenca	4,19	0,53	1,87	0,80	20,19	7,20	6,06	5,59	8,23	0,28	2,32	2,75	1,48	1,86	0,11	0,13	0,38	4,35	48,24	<0,1	69,65	0,12	70,37	0,44	44,33	14,65	1083,65
	H H Tabuenca	4,56	0,51	1,84	0,91	21,01	5,10	5,17	4,35	7,87	0,29	2,42	3,09	1,07	3,83	0,14	0,23	0,52	3,94	42,19	<0,1	79,93	0,10	42,84	0,64	86,27	19,43	2592,88
	H H Tabuenca	4,61	0,55	1,87	0,95	22,44	5,12	5,50	4,27	8,06	0,30	2,54	3,15	1,10	3,87	0,15	0,23	0,54	4,07	40,25	<0,1	80,33	0,11	43,28	0,66	88,32	19,83	2754,31

<DL: valores por debajo del límite de detección el método

Tabla3. Contenido en tioles varietales (expresados en ng/l).

		CODIGO LAEE	3-Mercapto hexyl acetate	Benzyl mercaptane	2-Furfurylthiol	3-Mercapto hexanol	4-Mercapto-4- methyl-2- pentanone
T	T_Ainzón	B2_rep1	0,17	0,32	0,84	1401	0,43
T	T_Ainzón	B2_rep2	0,15	0,27	0,87	1630	0,53
H	H_Ainzón	B1_rep1	0,09	0,26	0,43	564	0,58
H	H_Ainzón	B1_rep2	0,08	0,23	0,50	569	0,57
T	T_Magallón	B3_rep1	0,19	0,27	0,92	834	0,49
T	T_Magallón	B3_rep2	0,17	0,28	1,14	878	0,55
H	H_Magallón	B4_rep1	0,30	0,33	1,59	1434	0,77
H	H_Magallón	B4_rep2	0,33	0,36	1,61	1486	0,76
T	T_Fuendejalón	B6_rep1	0,29	0,24	1,03	1882	0,64
T	T_Fuendejalón	B6_rep2	0,32	0,32	1,05	1958	0,67
H	H_Fuendejalón	B5_rep1	0,14	0,15	0,83	1251	0,49
H	H_Fuendejalón	B5_rep2	0,14	0,18	0,91	1233	0,49
T	T_Pozuelo	B7_rep1	0,25	0,44	1,37	1485	0,72
T	T_Pozuelo	B7_rep2	0,23	0,42	1,20	1476	0,67
H	H_Pozuelo	B8_rep1	0,18	0,38	1,52	1241	0,65
H	H_Pozuelo	B8_rep2	0,19	0,38	1,72	1201	0,66
T	T_Borja	B10_rep1	0,17	0,38	0,88	1179	0,56
T	T_Borja	B10_rep2	0,19	0,35	0,81	1231	0,49
H	H_Borja	B9_rep1	0,15	0,15	0,54	1291	0,60
H	H_Borja	B9_rep2	0,16	0,15	0,55	1376	0,66
T	T_Tabuenca	B11_rep1	0,16	0,27	0,65	1320	0,67
T	T_Tabuenca	B11_rep2	0,15	0,28	1,05	1297	0,69
H	H_Tabuenca	B12_rep1	0,16	0,20	1,12	2004	0,74
H	H_Tabuenca	B12_rep2	0,16	0,25	1,12	1684	0,77

Tratamientos de datos

Diferencias comunes a todas las zonas

Para este tratamiento se procede a la realización de la *prueba t de Student*, prueba estadística que se utiliza para comparar las medias de dos grupos y poder comprobar si son estadísticamente diferentes. Lo haremos mediante la obtención del *valor p* (*valor de probabilidad*) que se interpreta como la probabilidad de obtener una diferencia distinta de cero sin más diferencias que las puramente aleatorias. Es un valor estadístico entre 0 y 1. Cuanto más bajo sea *p* más probabilidades hay de que la diferencia encontrada entre las medias sea debida a un comportamiento o diferencia real y no debido a la casualidad o variabilidad entre las muestras. Normalmente un valor $p < 0,05$ se toma como nivel de significatividad suficiente para considerar dos muestras estadísticamente diferentes.

Calculamos del valor medio de los dos análisis realizados a cada una de las muestras de cada una de las parcelas en cada uno de los compuestos analizados y además un valor de la suma de las concentraciones normalizadas de algunas de las familias químicas más importantes desde el punto de vista aromático y varietal: fenoles, terpenos, norisoprenoides y mercaptanos polifuncionales. (Tabla 4)

Tabla4. Valores medios por parcela del contenido en volátiles trazas (expresados en ug/l o áreas reañtovas) y tioles varietales (expresados en ng/l).

	T_Alnzón	H_Alnzón	T_Magallón	H_Magallón	T_Fuendejalón	H_Fuendejalón	T_Pozuelo	H_Pozuelo	T_Borja	H_Borja	T_Tabuenca	H_Tabuenca
R-limonene	8,02	9,93	8,95	5,49	7,72	8,59	5,76	4,86	4,25	4,43	4,30	4,58
1,8-Cineole	0,78	1,01	0,84	0,60	0,77	1,10	0,75	0,66	0,53	0,50	0,54	0,53
Linalool oxide (isómeros juntos)	1,41	1,58	1,18	1,49	1,52	1,03	1,12	1,61	1,53	1,40	1,85	1,86
Dihydro myrcenol	1,74	2,04	1,68	1,40	1,71	2,10	1,48	1,11	1,17	0,82	0,84	0,93
Vitispirane A and B (área relativa)	11,15	13,91	17,96	25,71	21,00	8,71	22,98	22,17	15,86	14,38	20,20	21,72
Linalool	4,03	5,45	3,04	3,75	3,26	4,23	2,76	3,09	4,02	2,04	7,25	5,11
Riesling Acetal (área relativa)	3,15	3,66	4,26	5,85	4,87	2,60	5,21	5,99	4,26	3,28	5,95	5,33
a-Terpineol	3,06	6,56	4,10	2,48	3,00	4,65	2,48	2,31	3,34	2,20	5,60	4,31
TDN	4,37	4,84	6,04	7,89	7,03	3,39	8,10	8,82	7,12	4,47	8,25	7,97
b-Citronellol	0,44	0,53	0,54	0,41	0,48	0,55	0,31	0,40	0,30	0,26	0,30	0,29
b-Damascenone	1,69	1,56	2,07	2,65	1,76	1,30	2,11	2,31	2,74	0,95	2,28	2,48
b-Phenylethyl acetate	2,31	2,57	2,87	3,46	2,28	1,79	3,02	3,27	3,69	1,41	2,83	3,12
Geraniol	0,68	1,02	0,56	0,70	0,54	0,76	0,49	0,61	0,85	0,38	1,46	1,08
Guaiaol	3,38	4,09	2,22	4,23	3,90	4,27	2,02	4,42	2,02	3,56	1,87	3,85
b-Ionone	0,23	0,25	0,24	0,20	0,22	0,29	0,20	0,20	0,15	0,12	0,12	0,15
o-Cresol	0,35	0,26	0,21	0,19	0,31	0,41	0,09	0,28	0,21	0,42	0,13	0,23
g-Nonalactone	0,56	0,75	1,23	1,39	0,95	1,23	0,57	1,09	0,43	0,57	0,37	0,53
m-Cresol	8,05	8,42	6,63	5,66	4,79	7,27	5,54	9,84	6,34	14,46	4,37	4,00
4-Vinylgualcol	46,13	42,67	33,73	45,50	39,61	41,28	44,42	71,41	38,95	55,04	47,11	41,22
Massolia lactone	--	--	0,93	1,42	1,11	0,69	1,05	--	--	--	--	--
Syringol	58,14	56,49	57,58	75,24	71,12	47,63	80,61	94,28	63,78	56,76	69,27	80,13
trans-Isoeugenol	0,11	0,18	0,13	0,14	0,13	0,09	0,10	0,13	0,12	0,13	0,12	0,10
4-Vinylphenol	46,47	64,94	51,94	64,80	47,21	39,00	83,79	157,05	44,45	84,12	69,86	43,06
Methoxy eugenol	0,50	0,55	0,35	0,79	0,36	0,43	0,43	0,89	0,50	0,44	0,43	0,65
Vanillin	71,74	55,41	63,44	111,64	71,25	57,75	57,49	91,30	61,94	56,72	44,24	87,79
Acetovanillone	19,83	13,45	10,60	16,10	14,13	17,72	9,39	22,51	14,18	10,57	14,56	19,63
Syring aldehyde	1833,50	759,72	1424,42	2627,09	1779,00	1159,46	1313,46	2034,20	2324,97	539,97	1088,45	2673,59
3-Mercapto hexyl acetate	0,16	0,08	0,18	0,32	0,30	0,14	0,24	0,19	0,18	0,16	0,15	0,16
Benzyl mercaptane	0,29	0,24	0,28	0,34	0,28	0,17	0,43	0,38	0,36	0,15	0,28	0,22
2-Furfurylthiol	0,85	0,47	1,03	1,60	1,04	0,87	1,29	1,62	0,84	0,54	0,85	1,12
3-Mercapto hexanol	1515,40	566,38	856,29	1460,17	1920,16	1242,43	1480,65	1220,73	1205,14	1333,44	1308,78	1843,74
4-Mercapto-4-methyl-2-pentanoni	0,48	0,57	0,52	0,76	0,66	0,49	0,69	0,65	0,53	0,63	0,68	0,76
suma fenoles	10,26	10,35	8,08	11,18	9,41	9,68	8,28	14,64	8,53	11,45	8,16	9,98
suma terpenos	8,36	11,27	8,51	7,24	8,07	9,74	6,54	6,76	7,05	5,18	9,28	7,99
suma norisoprenoides	3,98	4,39	5,14	6,26	5,31	3,69	5,76	6,08	5,03	3,31	5,46	5,60
suma mercaptanos varietales	1,91	1,35	1,49	2,33	2,50	1,73	2,23	1,98	1,76	2,03	2,08	2,61

Después se calcula el valor medio por compuesto o familia de compuestos de todas las concentraciones de las parcelas consideradas históricas y las consideradas testigo y se indica la diferencia entre las mismas, [Histórica-Testigo]. Con estos valores y sus correspondientes desviaciones estándar (SD) es con lo que se calculan los valores t y p. (Tabla 5) Se han marcado en rojo con fondo rojo los valores de $p < 0,05$, las diferencias significativas.

Igualmente, para ilustrar de forma más gráfica las diferencias, se muestran en escala de color las variaciones en % de diferencia sobre el valor de la media. Desde rojo (valores superiores en parcelas Históricas) hasta el verde (valores inferiores en parcelas Históricas).

Tabla 5. Valores de concentración medios, diferencia en [HIST-TEST], valores de desviación estándar (SD), valores T y p y escala de color de la %Dif.

	Media Testigos	Media Históricas	[Hist-Testigo]	SD_T	SD_H	Diferencia %	tEXP	p
R-limonene	6,50	6,31	-0,19	2,01	2,35	-2,9%	0,15	0,886
1,8-Cineole	0,70	0,73	0,03	0,13	0,25	4,3%	0,26	0,798
Linalool oxide (isómeros juntos)	1,43	1,49	0,06	0,27	0,27	4,0%	0,38	0,714
Dihydro myrcenol	1,44	1,40	-0,04	0,36	0,55	-2,6%	0,14	0,894
Vitispirane A and B (area relativa)	18,19	17,77	-0,42	4,24	6,43	-2,3%	0,13	0,896
Linalool	4,06	3,94	-0,12	1,65	1,27	-2,9%	0,14	0,895
Riesling Acetal (area relativa)	4,62	4,45	-0,17	0,96	1,45	-3,7%	0,24	0,819
a-Terpineol	3,60	3,75	0,16	1,11	1,74	4,2%	0,18	0,857
TDN	6,82	6,23	-0,59	1,44	2,26	-9,0%	0,54	0,604
b-Citronellol	0,40	0,41	0,01	0,10	0,12	2,8%	0,17	0,867
b-Damascenone	2,11	1,88	-0,23	0,38	0,70	-11,6%	0,71	0,494
b-Phenylethyl acetate	2,83	2,60	-0,23	0,52	0,84	-8,5%	0,57	0,578
Geraniol	0,77	0,76	-0,01	0,36	0,26	-0,9%	0,04	0,969
Guaiacol	2,57	4,07	1,50	0,85	0,31	45,3%	4,05	0,002
b-Ionone	0,19	0,20	0,01	0,05	0,06	3,8%	0,23	0,821
o-Cresol	0,22	0,30	0,08	0,10	0,10	30,7%	1,39	0,196
g-Nonalactone	0,68	0,85	0,16	0,33	0,33	21,4%	0,86	0,411
m-Cresol	5,95	8,27	2,32	1,35	3,66	32,6%	1,46	0,175
4-Vinylguaiacol	41,66	49,52	7,86	5,13	11,91	17,2%	1,48	0,169
Massoia lactone	--	--	--	--	--	--	--	--
Syringol	66,75	68,42	1,67	8,77	17,68	2,5%	0,21	0,840
trans-Isoeugenol	0,12	0,13	0,01	0,01	0,03	8,5%	0,80	0,443
4-Vinylphenol	57,29	75,49	18,21	15,95	43,21	27,4%	0,97	0,356
Methoxy eugenol	0,43	0,63	0,20	0,07	0,19	37,7%	2,46	0,034
Vanillin	61,68	76,77	15,08	10,18	23,53	21,8%	1,44	0,180
Acetovanillone	13,78	16,66	2,88	3,66	4,28	18,9%	1,25	0,239
Syring aldehyde	1627,30	1632,34	5,04	443,23	939,53	0,3%	0,01	0,991
3-Mercapto hexyl acetate	0,20	0,17	-0,03	0,06	0,08	-15,0%	0,71	0,494
Benzyl mercaptane	0,32	0,25	-0,07	0,06	0,09	-24,1%	1,49	0,167
2-Furfurylthiol	0,98	1,04	0,05	0,17	0,50	5,2%	0,24	0,812
3-Mercapto hexanol	1381,07	1277,82	-103,26	355,01	416,48	-7,8%	0,46	0,654
4-Mercapto-4-methyl-2-pentanone	0,59	0,64	0,05	0,09	0,11	8,5%	0,91	0,385
suma fenoles	8,79	11,21	2,43	0,87	1,81	24,3%	2,96	0,014
suma terpenos	7,97	8,03	0,06	1,00	2,18	0,8%	0,06	0,952
suma norisoprenoides	5,11	4,89	-0,23	0,61	1,26	-4,6%	0,40	0,698
suma mercaptanos varietales	2,00	2,00	0,01	0,36	0,44	0,3%	0,03	0,977

Como puede verse, cogiendo las zonas en su conjunto, las diferencias significativas afectan a los componentes del grupo de los fenoles volátiles: guaiacol, metoxieugenol y a la suma de todos los fenoles volátiles.

Diferencias de tipo global

Más allá de las diferencias entre componentes individuales, resulta interesante representar la relación existente entre las muestras en función de sus diferencias en contenidos aromáticos. Este tipo de representaciones se obtienen empleando una estrategia estadística denominada Análisis de Componentes Principales, que permite representar en un plano todas las muestras del set, en una representación en la que se retiene el máximo porcentaje máximo de la variabilidad inicial del conjunto de datos.

La representación se puede ver en la **Figura2** mostrada a continuación.

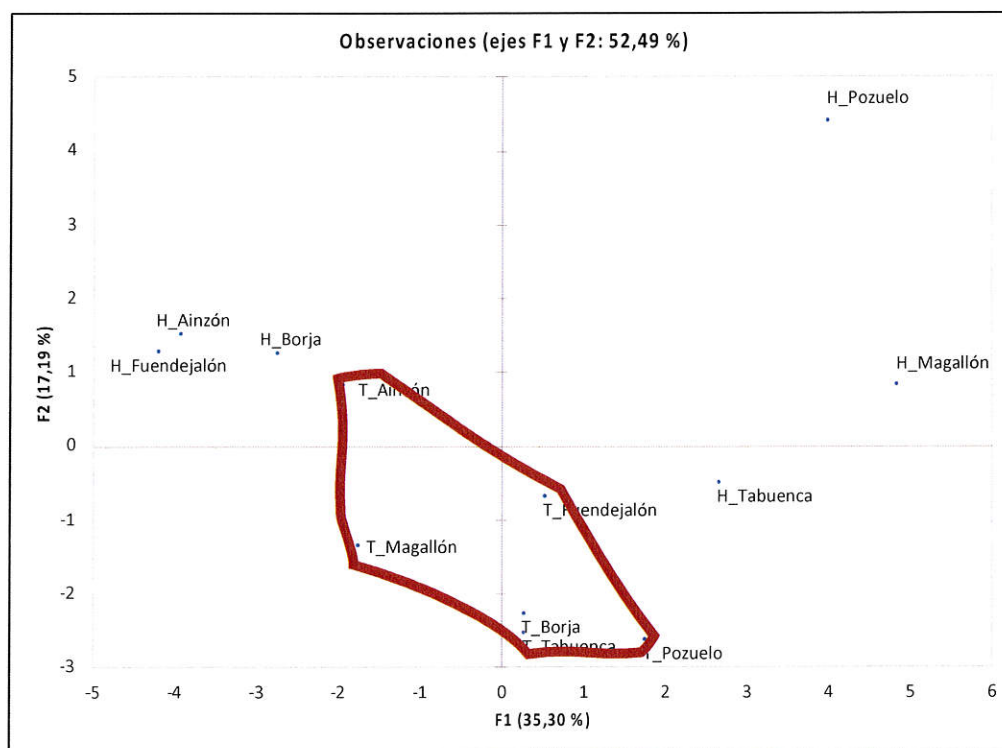


Figura 2. Proyección de las muestras en el plano formado por las dos Primeras Componentes del set de datos correspondiente a la composición aromática varietal de las 12 muestras de nuestro estudio.

Como puede apreciarse, las muestras se distribuyen siguiendo un patrón característico en el que las muestras testigo se encuentran en el centro-sur de la representación. Esto es, todas las muestras testigo tienen valores de la Componente 1 pequeños en términos absolutos, en concreto todas las muestras testigo tienen valores de esta componente comprendidos entre -2 (testigo de Ainzón) y +1,9 (testigo de Pozuelo), y todas ellas tienen valores de la componente 2 inferiores a 1, que es que tiene el testigo de Ainzón, y el resto, inferiores a -0,7.

Por el contrario, puede verse que todas las garnachas históricas tienen valores de la Componente 1 superiores a 2 en términos absolutos -a 3, si quitamos la de Borja-, y valores de la Componente 2 superiores a -0,5 -a 1, si quitamos la de Tabuenca. Si nos fijamos en las parejas de cada zona, puede verse que para Tabuenca, Magallón y Pozuelo, las muestras históricas tienen valores muy superiores de la Componente 1 (2,5 unidades la de Pozuelo, y 7 unidades la de Magallón) que las testigo, mientras que las de Fuendejalón, Ainzón y Borja, tienen valores de la Componente 1 claramente inferiores a sus testigos (desde algo más de 2

para Ainzón, a 4,5 la de Fuendejalón). Análogamente, todas las muestras históricas tuvieron niveles de la Componente 2 superiores a sus testigos, desde las poco más de 2 unidades de Tabuenca y la unidad escasa de Fuendejalón, a las 7 unidades de Pozuelo.

Esto es, los resultados muestran que las muestras testigo son más homogéneas y tienen una composición aromática “promedio”, mientras que las muestras históricas son más diversas y tienen una composición aromática que, indefectiblemente, va a ser más extrema, como vamos a ver en la representación siguiente.

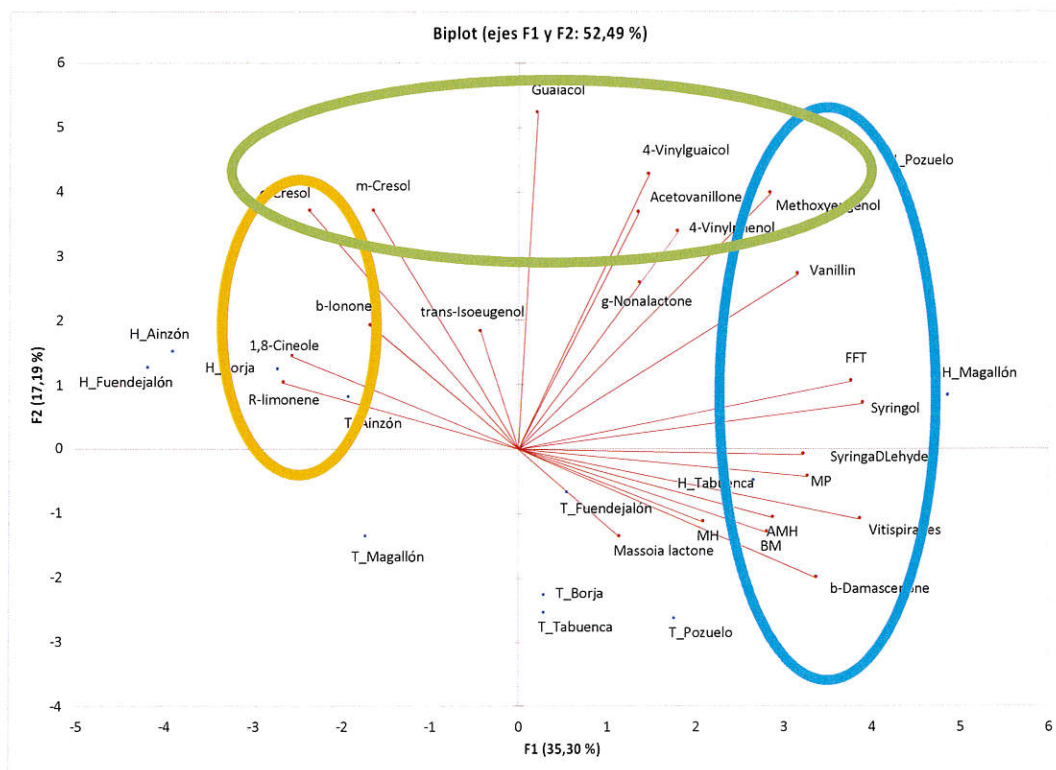


Figura 3. Representación de variables (factor loadings) y de muestras en el plano formado por las dos primeras componentes del PCA realizado sobre el conjunto de datos de aromas varietales derivados de las 12 muestras de garnacha del experimento.

En la **Figura 3** puede verse que los rasgos comunes a todas las muestras históricas (mayores valores de la Componente 2) vienen definidos por sus niveles significativamente superiores de guaiacol y otros fenoles volátiles, variables dentro del círculo verde, tal y como se vio en el primer tratamiento de datos. Pero la figura nos revela, además, que las garnachas históricas de Pozuelo, Magallón y Tabuenca, dentro del círculo azul, se caracterizan por tener mayores contenidos de vainillina, siríngol y siríngaldehído (que son compuestos relacionados con la vainillina), de vitispiranos, b-damascenona y, en menor medida, mercaptopentanona que sus testigos, mientras que las garnachas históricas de Ainzón, Fuendejalón y Borja se caracterizan por tener más limoneno, cineol y b-ionona, en el círculo naranja, que sus correspondientes testigos. También tienen más dihidromircenol (no representado en la figura).

Dado que no hay vínculos evidentes geográficos o edafoclimáticos entre las muestras de un lado u otro, podemos pensar que las diferencias se deben a factores clonales no conocidos.

Comentarios y conclusiones.

Los resultados reflejan que, en las condiciones estudiadas, las uvas procedentes de viñedos históricos presentan **contenidos en aromas varietales más diversos y extremos** que los encontrados en las uvas procedentes de viñedos equivalentes de menor edad.

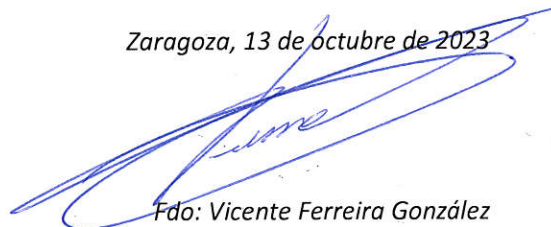
De manera general, las uvas procedentes de viñedos más antiguos pueden producir niveles entre un 38 y un 45% **significativamente más altos de guaiacol y metoxieugenol**, y de un 24% superior de la **familia de los fenoles volátiles varietales en general**.

De manera más específica, se ha observado que las viñas históricas de Borja, Fuendejalón y Ainzón, tienen niveles mayores de hidrocarburos terpénicos (limoneno, mirceno y cineol) y de b-ionona, mientras que las de Tabuenca, Magallón y Pozuelo, tienen cantidades superiores de vainillina, b-damascenona, vitispiranos, siringaldehído y siringol y 4-metil-4-mercaptopentanona.

Desde el punto de vista sensorial, estas diferencias indican que las parcelas históricas dan lugar a vinos de garnacha con estructuras aromáticas frutales y florales diferenciadas de los correspondientes testigos procedentes de uvas de viñas más jóvenes. Como notas comunes, los mayores niveles de componentes con aromas a **tostado y clavo**, harán que la fruta se perciba como más **fruta negra** que roja; pero según la procedencia se ha detectado que las uvas procedentes de parcelas más antiguas pueden además desarrollar aromas **más florales**, enriquecidos en terpenos y b-ionona, o más **frutales y especiados**, enriquecidos en b-damascenona y derivados vainillínicos.

La conclusión más clara del estudio es que se ha demostrado que la **edad del viñedo** afecta a de manera significativa y positiva a los niveles generales de uno de los **4 grupos más relevantes de metabolitos secundarios de aromas varietales**. Dado que estos metabolitos aromáticos están desde el punto de vista bioquímico, emparentados con los polifenoles, cabe inferir que es muy probable que algunas de las subfamilias de polifenoles también venga afectada por la edad del viñedo. Además, por factores que en el presente estudio no se pueden conocer, la edad del viñedo puede afectar de forma diferencial y positiva a los contenidos en familias específicas de aromas como son derivados vainílicos, hidrocarburos terpénicos, b-damascenona o b-ionona.

Zaragoza, 13 de octubre de 2023



Fdo: Vicente Ferreira González
Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE)
Universidad de Zaragoza