



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE
MUESTRA PARA METABOLÓMICA DE
VINO POR RESONANCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

TOVAR OSORIO KAREN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2020





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Araceli Patricia Peña Álvarez

Vocal: Francisco Ruiz Terán

Secretario: Nuria Esturau Escofet

1er Suplente: Ma. Rosa González Tepale

2do Suplente: Irán Ocaña Ríos

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Instituto de Química

Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear

ASESOR DE TEMA

Dra. Nuria Esturau Escofet

ASESOR TÉCNICO

Dra. Irán Ocaña Ríos

SUSTENTANTE

Tovar Osorio Karen

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas de la ciencia y la cultura.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al proyecto SAGARPA-2017-6-292836, plataforma nacional de metabolómica basada en espectroscopia de resonancia magnética nuclear (rmn)-omics para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario, por la beca otorgada.

Al Instituto de Química de la UNAM por brindarme los medios necesarios para desarrollar este trabajo.

A los miembros del H. Jurado por sus valiosas observaciones y comentarios de este trabajo.

A la Técnica Académica Dra. Beatriz Quiroz del LURMN del IQ por el apoyo en la adquisición de algunos espectros.

A la Dra. Nuria Esturau por sus enseñanzas y tiempo.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Hipótesis y objetivos	3
2.1. Hipótesis.....	3
2.2. Objetivo general	3
2.3. Objetivos particulares	3
3. Antecedentes.....	4
3.1. Vino	4
3.1.1. Procesos de fermentación.....	4
3.1.1. Composición del vino	7
3.2. Metabolómica	7
3.2.1. Técnicas analíticas utilizadas en metabolómica.....	8
3.2.2. Quimiometría.....	9
3.2.3. Resonancia Magnética Nuclear	9
3.3. Estudios del vino mediante metabolómica por RMN	12
3.3.1. Origen geográfico.....	12
3.3.2. Variedad de uva y condiciones de cultivo	13
3.3.3. Clasificación por año de cosecha.....	15
3.3.4. Evolución del vino en botella.....	16
3.3.5. Proceso de Fermentación	17
3.3.6. Cuantificación.....	17
3.4. Métodos de preparación de muestra.....	18
3.4.1. Análisis directo	19
3.4.2. Liofilización.....	20
3.4.3. Evaporación con N ₂	22
3.4.4. Extracción en fase sólida	22

4. Metodología.....	26
4.1. Muestras.....	26
4.2. Análisis directo	26
4.3. Liofilización.....	27
4.4. Evaporación con nitrógeno.....	27
4.5. Extracción en fase sólida.....	27
4.5.1. Procedimientos	27
4.5.2. Optimización	28
4.5.2.1. Procedimiento optimizado.....	28
4.6. Adquisición de los experimentos de RMN	29
4.6.1. Procesamiento	30
4.7. Identificación de metabolitos	30
5. Resultados y discusión.	31
5.1. Espectros de RMN del vino	31
5.1.1. Identificación de metabolitos en análisis directo	33
5.2. Espectros tras la evaporación con N ₂	38
5.3. Espectros tras la liofilización.....	39
5.4. Espectros tras la extracción en fase sólida	40
5.4.1. Selección del procedimiento.	40
5.4.2. Optimización de la metodología	41
5.4.2.1. Cantidad de adsorbente y volumen de muestra.....	41
5.4.2.2. Selección de disolventes de elución.	42
5.4.2.1. Selección de disolventes de reconstitución.....	44
5.4.3. Repetibilidad de la extracción en fase sólida	45
5.4.4. Análisis de muestras con EFS	48
5.4.5. Comparación de EFS y análisis directo.....	51

6. Conclusión.....	52
7. Bibliografía.....	53

Listado de Acrónimos.

Vino	Bebida resultante de la fermentación alcohólica del mosto de uva.
Muestra	Porción de vino utilizada para estudiar sus metabolitos
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
EFS	Extracción en Fase Sólida
mL	Mililitros
MHz	Megahertz
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón unidimensional
H ₂ O	Agua
DCM	Diclorometano
MeOH	Metanol
D ₂ O	Agua deuterada
MeOD-d ₄	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio di hidrogenado
M	Molar
TSP	Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico
mM	Milimolar
pH	Potencial de hidrógeno
mm	Milímetros
μL	Microlitros
°C	Grados centígrados
BTpH	Unidad de titulación de pH combinada Bruker
FID	Decaimiento por inducción libre
Hz	Hertz
N ₂	Nitrógeno gaseoso
PCA	Análisis de componentes principales

1. Introducción

El vino es una bebida alcohólica que se produce de la fermentación del mosto*; los factores que influyen en su composición son: la variedad de uva, la cepa de levadura utilizada, el *terroir*, los procesos de fermentación, la edad del vino y las técnicas de vinificación empleadas, por esto el vino es una matriz muy compleja cuyo análisis no es una tarea sencilla. Continuamente es necesario desarrollar métodos analíticos robustos y eficaces para su caracterización.

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica muy robusta, versátil, rápida y no destructiva. En general, la RMN es la herramienta más poderosa para la determinación estructural de las moléculas orgánicas, pero en los últimos años su aplicación para el análisis de diversos productos como los del sector agroalimentario, junto con la más reciente de las tecnologías ómicas, la Metabolómica, ha abierto nuevas perspectivas, permitiendo cambiar e incrementar los objetivos en los estudios para obtener, por ejemplo, “el perfil espectral” o “la huella dactilar” de un producto, lo que es una imagen completa de su composición. A nivel mundial existen muchas aplicaciones de esta metodología a niveles académico, industrial e incluso regulatorio; sus aplicaciones a productos del sector agroalimentario tienen diversos enfoques como son: el análisis de sus componentes, la evaluación de la calidad, la determinación de origen, la detección de adulteraciones, etc.

En el campo de la aplicación de la metabolómica basada en RMN al vino, la técnica se ha utilizado para investigar la autenticación del mismo. El espectro de RMN de una muestra de vino se puede considerar como una huella dactilar molecular, y como tal se puede usar directamente para fines de comparación e identificación de diferentes vinos. Esta información química composicional / espectroscópica constituye el metaboloma del vino, que se ve afectado por una multitud de factores relacionados con la vinificación, incluidas: las prácticas agronómicas y las

* Jugo obtenido del estrujado y prensado de la uva, destinado a la elaboración de vino

condiciones pedoclimáticas, la variedad de uva, las prácticas de fermentación y el origen, y puede ser utilizado para fines de control de calidad y autenticación.

Este trabajo, es parte del proyecto SAGARPA-CONACYT No. 292836 “Plataforma nacional de metabolómica en espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario” cuya finalidad es crear una base de datos de Huellas dactilares de ^1H -RMN para vinos de México.

El objetivo de la presente tesis es realizar el estudio bibliográfico de los diferentes protocolos de tratamiento y análisis de vino para implementarlos en el laboratorio y conocer sus ventajas y limitaciones. Los métodos probados son: el análisis directo (con la adición de agua deuterada a la muestra de vino en una relación 9 a 1), la pre-concentración con métodos como liofilización, la evaporación bajo flujo de nitrógeno y la extracción en fase sólida.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

Con el método de análisis directo de las muestras de vino se obtendrá un perfil espectral de los compuestos mayoritarios del vino; mientras que con los métodos de pre-concentración como liofilización o evaporación con nitrógeno, aumentarán la sensibilidad del análisis detectando un mayor número de metabolitos, y la extracción en fase sólida (fase poliestireno divinilbenceno) concentrará compuestos aromáticos y alcoholes superiores.

2.2. Objetivo general

Obtener el perfil espectroscópico de ^1H -RMN de muestras de vino con los diferentes procedimientos de preparación reportados en la literatura, para evaluarlos en cuanto a los metabolitos observables.

2.3. Objetivos particulares

- 1) Realizar la búsqueda bibliográfica de los protocolos existentes para el tratamiento y análisis de muestras de vinos mediante RMN.
- 2) Preparar muestras de vino mexicano con los diferentes métodos de preparación seleccionados.
- 3) Adquirir las muestras de vino y procesar los espectros de ^1H -RMN.
- 4) Realizar la identificación de los metabolitos presentes en las muestras de vino mediante software de reconocimiento de patrones.
- 5) Analizar y comparar el perfil espectral de los vinos en función del método de preparación de la muestra.

3. Antecedentes

3.1. Vino

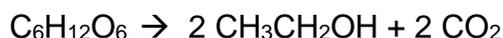
El vino es una bebida alcohólica que se obtiene de la fermentación del mosto; está constituido por una gran cantidad de compuestos, los principales son: agua, alcoholes, proteínas, aminoácidos, carbohidratos y polifenoles.¹

El vino es una matriz muy compleja debido a que durante su elaboración tienen lugar diferentes procesos, entre los que están las fermentaciones alcohólica y maloláctica. La primera es responsable de la formación de etanol, que es uno de los componentes principales del vino, y se forma a partir de los azúcares de la uva. La segunda es responsable de la formación del ácido láctico.

3.1.1. Procesos de fermentación

Dentro del proceso de vinificación ocurren diversos procesos bioquímicos, no obstante, las fermentaciones alcohólica y maloláctica son las más importantes.

La fermentación alcohólica es un proceso anaerobio donde la levadura (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*) convierte los azúcares, especialmente glucosa y fructosa, en etanol y dióxido de carbono, siendo la reacción global:



Sin embargo, el proceso no es tan simple ya que existen reacciones adicionales en las que se forman subproductos en menor cantidad, como alcoholes superiores, 2,3-butanodiol, glicerol, ésteres y ácido succínico, entre otros, que contribuyen a la complejidad organoléptica del vino.²

La principal vía metabólica presente es la de Embden-Meyerhof-Parnas (glicólisis) de donde se obtiene el piruvato que se descarboxila para dar acetaldehído, y mediante el NADH se realiza una reducción cuyo producto principal es el etanol, como se muestra en la Figura 1.³

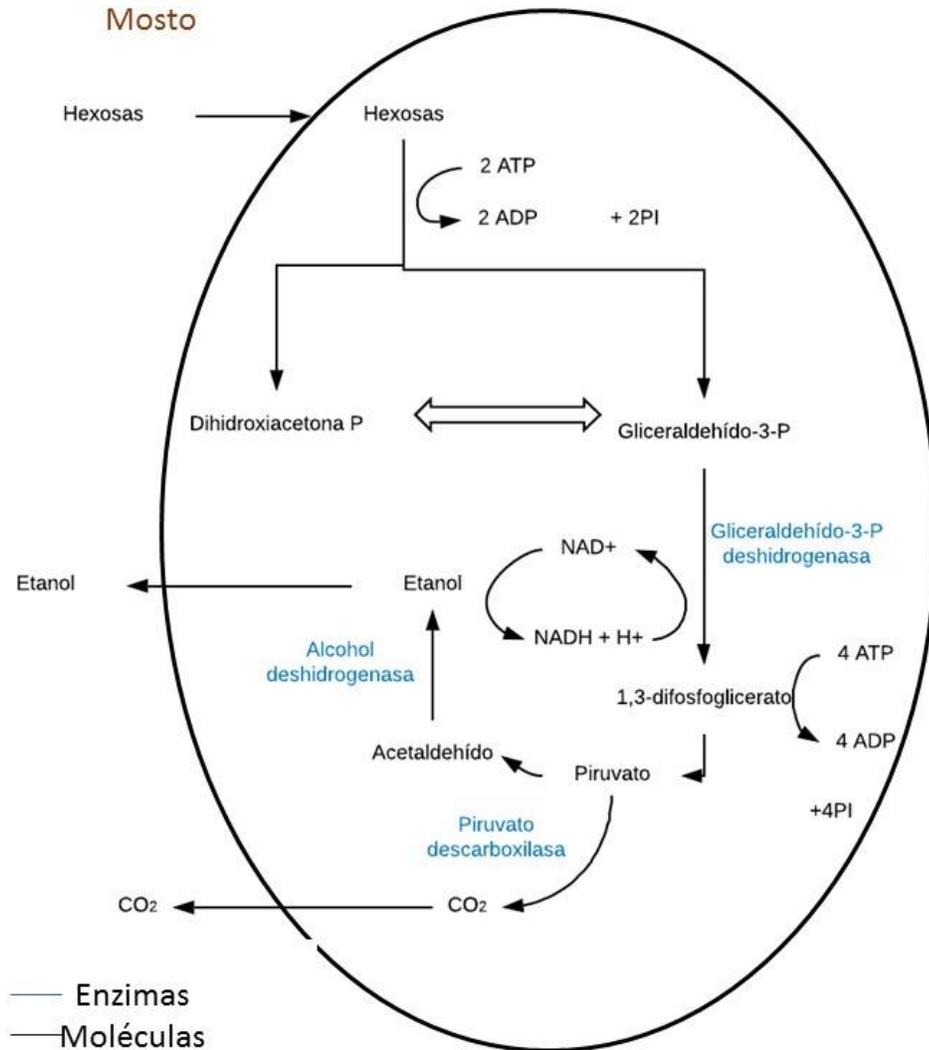


Figura 1. Fermentación alcohólica.²

P: Fosfato

La ruta alterna que siguen los azúcares es la gliceropirúvica, donde por falta de acetaldehído la dihidroxiacetona fosfato, proveniente de la glicólisis, se transforma en glicerol, acumulando piruvato que se transforma en los subproductos secundarios 2,3-butanodiol, ésteres y ácido succínico, como se muestra en la Figura 2. Esta vía alterna tiene lugar en las primeras etapas de la fermentación alcohólica cuando las levaduras necesitan una alta cantidad de piruvato para duplicarse.⁴ Los principales factores que afectan la fermentación alcohólica son la temperatura, la cepa de levadura utilizada y la cantidad de azúcares presentes en el mosto.⁶

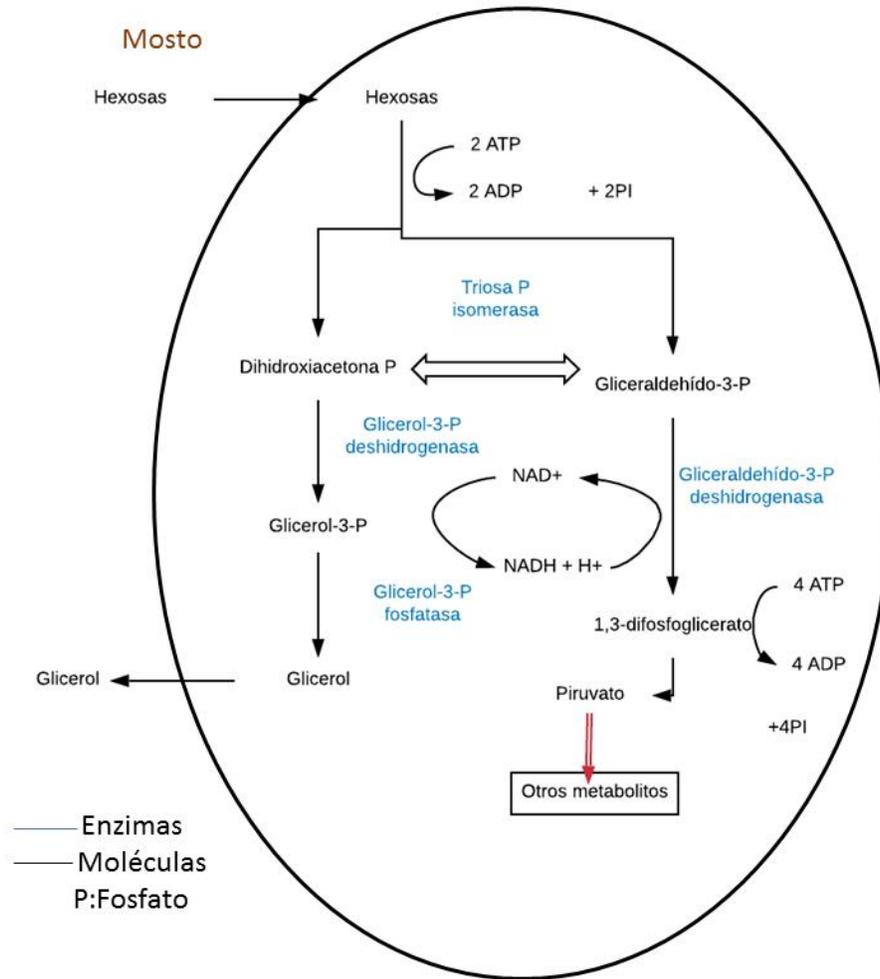


Figura 2. Fermentación gliceropirúvica.²

La fermentación maloláctica puede o no ser llevada a cabo dependiendo de las características organolépticas del vino; generalmente es más común en el proceso de vinificación del vino tinto. Es efectuada por bacterias lácticas, como *Oenococcus oeni* y consiste en la descarboxilación del ácido L-málico para formar ácido L-láctico y CO_2 , mediante la enzima maloláctica EML (

Figura 3).

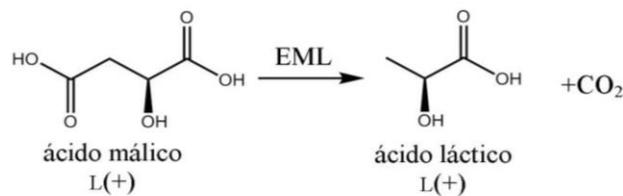


Figura 3. Fermentación maloláctica

3.1.1. Composición del vino

A lo largo del proceso de fermentación del mosto en vino, muchos de sus compuestos aparecen y desaparecen en un constante equilibrio. La composición del vino está influenciada por diversos factores como son: la variedad de la uva, la región de origen donde se cultivó la vid y el proceso de fabricación, pero en general se pueden distinguir varias clases de compuestos como son: ácidos orgánicos, alcoholes, carbohidratos, aminoácidos y compuestos aromáticos, los cuales se encuentran en diferente proporción dependiendo del tipo de vino. Algunos de estos compuestos se muestran en la Tabla 1: ⁵

*Tabla 1. Componentes generales del vino tinto y blanco.*⁵

Ácidos orgánicos		Alcoholes	Carbohidratos	Aminoácidos	Aromáticos
Acético	Cítrico Succínico Shikímico Tartárico	Etanol	Glucosa	Prolina	Taninos Antocianinas Terpenos Flavonoides
Fumárico		2,3-Butanodiol	Fructosa	Valina	
Láctico		Metanol	Arabinosa	Alanina	
Oléánico		Glicerol	Ramnosa	Arginina	
Málico		Fenoles	Xilosa	Glutamato	

Un grupo muy importante en cuestión regulatoria son los alcoholes, de éstos el compuesto más importante y abundante en el vino es el etanol. En condiciones estándar de fermentación, puede llegar de entre 10 a 15% v/v dependiendo de diversos factores que afectan su producción como son: la concentración de azúcar, la temperatura y la cepa de levadura utilizada. Otro alcohol importante es el metanol, este se produce cuando la pectina que se encuentra en la piel de uva se hidroliza por la enzima pectina metil esterasa presente en el mosto; dicha enzima rompe de la cadena el grupo metilo del ácido poligalacturónico liberando metanol y convirtiendo pectina en pectato.⁶

3.2. Metabolómica

La metabolómica es una plataforma analítica perteneciente a las ciencias “ómicas” que consiste en la caracterización, identificación y cuantificación de un gran número de metabolitos presentes en un sistema u organismo particular.⁷

Estos metabolitos representan los productos finales de la expresión génica y la acción de las proteínas. A diferencia de las otras ciencias ómicas; genómica y proteómica, la metabolómica nos permite establecer la relación de los productos finales del genoma con factores ambientales, evaluando así su impacto dentro de un sistema. La metabolómica ha sido aplicada en varias áreas de interés como medicina, biología, medio ambiente y alimentos. La metabolómica aplicada al estudio de los alimentos se define como *foodomics*, la cual combina técnicas analíticas avanzadas y bioinformática para un estudio más completo de los alimentos, que son matrices muy complejas. La metabolómica de alimentos es una herramienta muy útil para detectar pequeños cambios en las concentraciones de metabolitos inducidos por aditivos o factores externos.⁸

3.2.1. Técnicas analíticas utilizadas en metabolómica

En los últimos años se han utilizado distintas técnicas analíticas para el estudio de la metabolómica, las más utilizadas son RMN y espectrometría de masas acoplada a técnicas de separación como cromatografía de gases, cromatografía de líquidos y electroforesis capilar.⁹

Estas técnicas tienen ventajas y desventajas. Por un lado, la espectrometría de masas acoplada a técnicas de separación es altamente sensible y detecta una gran cantidad de metabolitos, sin embargo, es una técnica destructiva que requiere de un tratamiento de muestra previo al análisis. Por otro lado; aunque la RMN tiene menor sensibilidad, es una técnica muy reproducible, requiere poco tratamiento de muestra, no es destructiva, es eficiente en la identificación de metabolitos desconocidos, es fácilmente automatizable y permite la cuantificación de compuestos en mezclas complejas sin necesidad de derivatización.^{10,11,12}

Los datos de RMN resultantes proporcionan una gran cantidad de información sobre las muestras; no obstante, interpretarla se vuelve complicado, por lo que es necesario utilizar métodos estadísticos que tomen en cuenta la contribución de varios factores y permitan un análisis exploratorio y exhaustivo como la quimiometría.¹³

3.2.2. Quimiometría

La quimiometría es una disciplina que aplica las técnicas matemáticas de la estadística a los problemas analíticos de la identificación y cuantificación de las sustancias químicas.¹⁴

Tiene dos categorías principales de análisis: ¹⁵

- Métodos supervisados o análisis exploratorio: Proporciona una visión general de todos los datos para detectar tendencias, patrones o agrupaciones.
- Métodos no supervisados o análisis de clasificación y análisis discriminante: Clasifica muestras en categorías o clases.

En la categoría de análisis exploratorio el análisis de componentes principales (PCA) es el método más utilizado para el análisis de datos multivariados sin supervisión. PCA se puede utilizar para extraer y visualizar la variación sistemática en una matriz de datos y tiene capacidades de reducción y presentación de datos extraordinariamente robustas. En PCA, el conjunto de datos multivariado (espectral) se descompone en componentes ortogonales cuyas combinaciones lineales aproximan el conjunto de datos original en un sentido de mínimos cuadrados.¹⁶

3.2.3. Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética nuclear es una técnica analítica utilizada ampliamente en control de calidad y en investigación para la elucidación estructural de moléculas. Esta técnica se basa en la absorción de energía electromagnética en la región de radiofrecuencias de los núcleos atómicos con un momento magnético de espín nuclear no nulo (diferente de 0), es decir núcleos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos).¹⁷

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar y son equivalentes en energía (estado degenerado). Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético (B_0) (Figura 4) los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín α , mientras que los núcleos con espín negativo se

orientan en dirección opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β .¹⁸

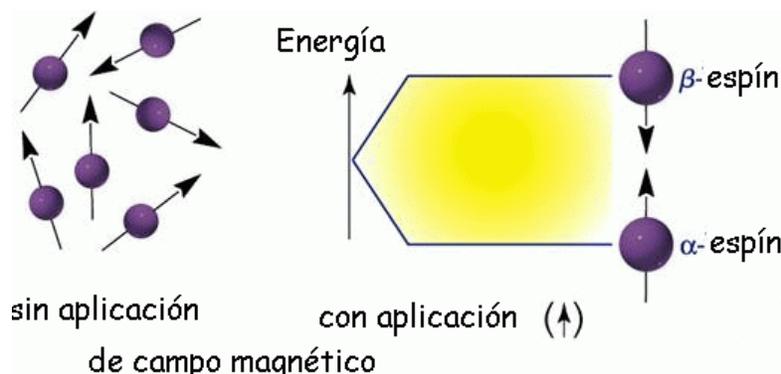


Figura 4. Ejemplificación de los estados de espín de los núcleos.¹⁷

Esta alineación en contra o a favor del campo es descrita mediante la distribución de Boltzmann (Ecuación 1). Además, al estar alineados con B_0 los espines nucleares describen un movimiento de precesión a una frecuencia proporcional al campo aplicado, llamada frecuencia de Larmor.

$$\frac{N\beta}{N\alpha} = e^{\Delta E/KT}$$

Ecuación 1. Distribución de Boltzmann

Al aplicar una frecuencia similar a la frecuencia de Larmor se origina una diferencia de energía (ΔE); producto de la absorción y emisión de esta al perturbar el equilibrio de los estados α y β de los espines nucleares, que después regresa a su estado de equilibrio, y es esta señal que generan al regresar a su estado degenerado lo que se mide en RMN para procesar y obtener el espectro.

La frecuencia a la que se produce la transición de estados depende del campo magnético aplicado por lo tanto, un aumento en el campo magnético produce a su vez un aumento en la diferencia de energía entre los niveles de espín, y dado que la intensidad de la señal de RMN es directamente proporcional a la ΔE la señal se incrementará teniendo mayor sensibilidad.¹⁹

A continuación se describirá la información principal obtenida en un espectro de RMN de protón (^1H -RMN); el desplazamiento químico y el acoplamiento espín-espín.

Desplazamiento químico: Las frecuencias de resonancia de los núcleos, dependen del entorno químico. Esto se debe a que los electrones que rodean cada núcleo generan un campo magnético que se opone al campo magnético aplicado, en consecuencia el campo sobre el núcleo es menor si hay una mayor densidad electrónica, esta variación de frecuencia genera una señal única y se traduce en el espectro como distintos desplazamientos químicos.²⁰

Acoplamiento espín-espín: Se da debido a los acoplamientos entre núcleos vecinos a través de los electrones de los enlaces, traduciéndose en acoplamientos escalares cuya medida son las constantes de acoplamiento (J).²¹ El efecto de este acoplamiento es la modificación de los niveles de energía (α y β), cambiando por lo tanto el valor del campo magnético que llega al núcleo y produciendo una ligera diferencia de frecuencia; por lo que un hidrógeno acoplado con otro hidrógeno vecino tendrá dos señales diferentes con una distancia entre ellas que reflejara la fuerza del acoplamiento entre ambos espines (J) (Figura 5). A este desdoblamiento de señales se le llama multiplicidad.²²

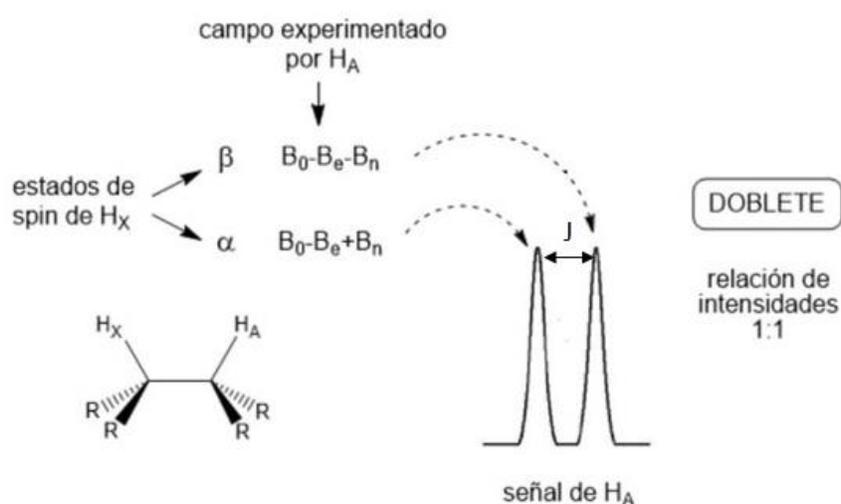


Figura 5. Ejemplo del efecto del acoplamiento espín-espín.²²

3.3. Estudios del vino mediante metabolómica por RMN

El estudio metabolómico por RMN aplicado a la enología tiene sus comienzos en 1999,²³ es una metodología no destructiva que permite realizar el seguimiento de diversos compuestos durante la elaboración del vino sin necesidad de tratamientos previos de la muestra. El principal objetivo es obtener el perfil espectral para tener trazabilidad del vino. Los principales temas de estudio van encaminados a garantizar su autenticidad y su calidad, a través de conocer el efecto en la composición metabólica del vino en: la variedad de uva, su origen geográfico, el añejamiento y el proceso de fermentación.

3.3.1. Origen geográfico

El conjunto de características especiales que le otorga al vino la interacción genética de las plantas con la geografía, la geología, las técnicas de cultivo y el clima de una determinada región; afectan el cultivo de uva y en consecuencia la calidad y el precio del vino.²⁷

La metabolómica basada en RMN se ha utilizado ampliamente para clasificar las muestras de vino según su origen geográfico, y así diferenciar los vinos producidos en diferentes regiones. Dicha clasificación se ha realizado tanto entre zonas geográficas separadas por grandes distancias, por ejemplo se realizó con vino tinto Cabernet Sauvignon proveniente de tres países diferentes: Australia, Francia y California,²⁴ como también se han clasificado vinos provenientes de regiones muy cercanas y delimitadas dentro de un mismo país como en España, Italia y Alemania.²⁵⁻²⁸ También se estudió el efecto de las condiciones climáticas en los metabolitos del vino.²⁹

En la Tabla 2 se muestran algunos estudios en los que se aplicó la RMN para determinación de origen geográfico.

Tabla 2. Estudios realizados mediante RMN aplicados a denominación de origen

Año	Aplicación	Ref.
2008	Diferenciaron vinos Cabernet Sauvignon de acuerdo con la región de origen de Australia, Francia y California. Los metabolitos que contribuyen a la separación son: 2,3-butanodiol, lactato, acetato, prolina, succinato, malato, glicerol, tartrato, glucosa y compuestos fenólicos.	24
2008	Identificaron la región de procedencia de 10 vinos del sur de Italia mediante la cuantificación e identificación de los metabolitos: glucosa, glicerol, ácido succínico, prolina, alanina, ácido láctico, 2,3-butanodiol, leucina e isoleucina.	25
2010	Diferenciaron tres vinos provenientes de diferentes regiones de Italia, mediante seis metabolitos: α -hidroxiisobutirato, ácido láctico, ácido succínico, glicerol, α -fructosa y ácido β -D-glucurónico. Los análisis multivariados confirmaron que la diferenciación entre los vinos estaba relacionada con el microclima y el contenido de carbonato, arcilla y materia orgánica de los suelos.	26
2012	Diferenciaron muestras provenientes de bodegas cercanas en la Rioja España mediante el análisis multivariante iECVA (análisis de variables canónicas extendidas por intervalos). Se descubrió que los compuestos alcohol isoamílico e isobutanol son biomarcadores clave para lograr esta diferenciación.	27
2013	Diferenciaron por origen geográfico de vinos de las regiones productoras de vino más grandes de Alemania, Rheinpfalz, Rheinhessen, Mosel, Baden y Württemberg, con un 89% de confianza.	28
2017	Diferenciaron muestras de vino producido en tres áreas de la región italiana "Piamonte". Se estudió también la influencia de los factores climáticos, concluyendo que temperaturas altas y una reducción de precipitaciones durante la maduración de la uva provocaron que se produjera una mayor cantidad de azúcar repercutiendo en los vinos en un mayor contenido de alcoholes, glicerol y tartrato.	29

3.3.2. Variedad de uva y condiciones de cultivo

Una de las variables importantes que contribuye a que los vinos tengan una composición diferente es la variedad de uva, la cual está influenciada por las características genéticas de la uva y las condiciones ambientales de la región de cultivo.³²

En este tema los estudios realizados por RMN y análisis multivariable han permitido la correcta diferenciación de distintas variedades de uva,^{31-32 34 36-39} además de la influencia del sombreado de baya durante el cultivo y el impacto sensorial de ambos factores en el vino.³³ También ha permitido establecer la relación genética de la uva con las características fenotípicas de las variedades de uva.³⁵

En la Tabla 3 se muestran algunos estudios de RMN aplicados a la variedad de uva. Como se puede observar, los biomarcadores identificados son distintos para cada estudio; sin embargo, dos de los más reportados son prolina y 2,3-butanodiol. Esto puede deberse a que la prolina es el aminoácido predominante; al no ser metabolizada por la levadura presente en el vino en condiciones de anaerobiosis, convirtiéndola en indicador importante de la variedad de uva por la poca variación de su concentración durante el proceso de fermentación.³⁰ En cuanto al 2,3-butanodiol sus diferentes niveles de concentración en los vinos tintos podrían ser causados por la variación en el contenido de azúcar en los mostos o bayas de uva.³²

Tabla 3. Estudios por RMN aplicados a determinación de variedad de uva.

Año	Aplicación	Ref.
2008	Diferenciaron los vinos de las uvas Campbell Early, Cabernet Sauvignon y Shiraz. Los metabolitos que contribuyen a la diferenciación son: 2,3-butanodiol, lactato, acetato, prolina, succinato, malato, glicerol, tartrato, glucosa y compuestos fenólicos.	31
2009	Diferenciaron cuatro variedades de uva: Muscat Bailey A, Campbell Early, Kyoho y Meoru. En los vinos Kyoho se encontraron los niveles más altos glicerol, 2,3-butanodiol, succinato y etanol lo cual sugiere un mayor contenido de azúcar en la baya de esta uva. En los vinos Muscat Bailey se encontró un mayor contenido de citrato y trigonelina; en los vinos Campbell Early de alanina; y en los vinos Meoru un mayor contenido de prolina, malato y colina.	32
2010	Se comparó el análisis sensorial con RMN-multivariante para la identificación de variedad de uva y el sombreado de baya. El análisis metabólico permitió la clasificación de los vinos según la variedad de uva y el tratamiento de sombra, de manera similar a la del análisis sensorial.	33
2015	Diferenciaron vinos tintos por variedad de uva utilizando análisis de componentes independientes (ICA), LDA y FDA. Se llegó a la conclusión de que el método ICA / LDA es preferible a ICA / FDA para tareas de reconocimiento basadas en la medición espectroscópica de RMN.	34

2015	Diferenciaron vinos de cinco variedades de uva relacionados genéticamente comparando los perfiles semicuantitativos de los metabolitos discriminantes de cada cultivar. Los cultivares se distinguieron claramente y hubo una correlación general entre su agrupación y su homología genética, según lo revelado por estudios genómicos. Las diferencias en prolina, valina y ácido gálico, que son metabolitos derivados de la uva, fueron asociadas con diferencias genéticas.	35
2015	Se estudiaron 22 vinos monovarietales provenientes del sur de Italia los cuales se caracterizaron usando RMN y CLAR-EM. La RMN y la quimiometría se utilizaron para identificar los siguientes metabolitos: prolina, alanina, tirosina, ácidos orgánicos (málico, láctico, acético y succínico), 2-feniletanol, sacarosa y ácido gálico. Asegurando la calidad y autenticidad de cada vino.	36
2016	Diferenciaron cinco variedades auténticas de vino tinto del centro vinícola Murfatlar en Rumania. Los biomarcadores discriminantes fueron los diferentes niveles de antocianinas, shikimato, lactato, citrato, succinato, 2,3-butanodiol, metanol, glucosa, alanina, histidina e isoleucina.	37
2018	Diferenciaron entre dos variedades de uva Cabernet Sauvignon y Shiraz de una misma región, la diferencia se hizo por un cambio en la concentración de prolina, ácido tartárico, glicerol, ácido láctico, colina, ácido succínico y ácido gálico.	38
2018	Diferenciaron variedades de uva de vinos chinos tintos. Se observó una separación significativa para los vinos de variedades Campbell Early, Cabernet Sauvignon y Shiraz utilizando PCA.	39

*LDA: Análisis discriminante lineal, FDA: Análisis factorial discriminante, PCA: Análisis de componentes principales (por sus siglas en inglés), CLAR-EM Cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas.

3.3.3. Clasificación por año de cosecha.

La clasificación de vinos por añada toma en cuenta los cambios macro y microclimáticos, que dependen del año de cosecha y pueden afectar la composición química de las uvas. En los estudios revisados se distinguen entre añadas de vino provenientes de Verona utilizando como biomarcadores compuestos aromáticos y aminoácidos.⁴⁰ Mientras que en el otro estudio se distingue entre dos añadas de vinos alemanes concluyendo que el perfil fenólico es el más importante para esta distinción.²⁸ Los estudios antes mencionados se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Estudios realizados mediante RMN aplicados a clasificación por añada.

Año	Aplicación	Ref.
2011	Diferenciaron tres añadas distintas (2005-2007) de vino tinto "Passito" de Amarone producido en el área de Verona mediante PCA y PLS. Las variables discriminantes son los aminoácidos, azúcares y compuestos aromáticos. Los vinos de añadas más recientes están enriquecidos con compuestos aromáticos mientras que los menos recientes con aminoácidos, lo cual podría deberse a la degradación de la proteína de la uva.	40
2013	Diferenciaron vinos alemanes mediante PCA, LDA y MANOVA, concluyendo que el perfil fenólico de los vinos permite la discriminación entre los vinos de diferentes añadas para vinos de la misma variedad. La clasificación de la cosecha de todos los vinos analizados dio como resultado predicciones correctas de 97 y 96%, respectivamente, para la cosecha 2008 (n = 318) y 2009 (n = 265).	28

*Por sus siglas en inglés, PCA: Análisis de componentes principales, PLS: Regresión por mínimos cuadrados parciales, LDA: Análisis discriminante lineal, MANOVA: Análisis multivariante de la varianza.

3.3.4. Evolución del vino en botella.

La evolución del vino en botella, consiste en su evolución en condiciones donde el contacto con el oxígeno es mínimo. En este, se observa un cambio de color y una mejora en las características sensoriales del vino. El potencial redox, pH, humedad y temperatura determinan las condiciones durante la evolución del vino en botella. Durante este proceso, el vino es particularmente sensible a la temperatura de almacenamiento y a la radiación de la luz. Está reportado un estudio para determinar la etapa de evolución en la que se encuentran los vinos, identificando metabolitos característicos como ácidos orgánicos y ésteres. En este estudio analizaron diez vinos tintos y blancos de diferentes regiones de Piedmont Estados Unidos, en donde se adquirieron espectros de RMN tres meses posteriores a su embotellamiento y a los 48 meses en condiciones climáticas controladas, similares a las que se tienen en botella. Durante el proceso de evolución, en la mayoría de los vinos se observó una disminución en los ácidos orgánicos (ácidos láctico, succínico y tartárico), así como un aumento en los ésteres (acetato de etilo y lactato de etilo). Por otro lado, para todos los vinos estudiados se tuvo una disminución de catequina y epicatequina. El ácido gálico aumentó solo en los vinos tintos.⁴¹

3.3.5. Proceso de Fermentación

Como ya se mencionó anteriormente, en el vino se llevan a cabo dos fermentaciones, la alcohólica y la maloláctica, y ambos procesos se han estudiado por RMN. En un trabajo se estudió el impacto metabólico que tiene la fermentación alcohólica en los componentes del vino, realizando el monitoreo y cuantificación de distintos metabolitos.⁴² También, está reportado la cepa de microorganismo utilizada para ambas fermentaciones, y su relación con los diferentes metabolitos que se producen y qué metabolitos nos permiten distinguir entre fermentación alcohólica y maloláctica.^{43,44} En la Tabla 5 se describen algunos de estos estudios

Tabla 5. Estudios realizados mediante RMN aplicados a procesos de fermentación

Año	Aplicación	Ref.
2009	Monitorearon los niveles de metabolitos del vino durante los procesos de fermentación. Realizaron la cuantificación simultánea de etanol, ácidos orgánicos (acético, málico, láctico y succínico) y aminoácidos (prolina y alanina).	42
2009	Compararon el comportamiento fermentativo y los efectos metabólicos de la bacteria <i>L. plantarum</i> y la cepa comercial <i>Oenococcus oeni</i> durante la fermentación maloláctica. Los vinos con FML se caracterizaron por niveles altos de ácido láctico, fenilalanina, uracilo, ornitina, alanina, treonina, leucina, isoleucina y valina, butanal, isobutirato de etilo, isobutanol, acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, hexanoato de etilo, glicina, ácido acético.	43
2009	Estudiaron los cambios en los metabolitos del vino durante la FML inducida con bacterias lácticas y se comparó con vinos que tenían únicamente levaduras. La diferenciación se dio por la disminución de los niveles de malato y citrato junto con el aumento de los niveles de lactato en los vinos inducidos por FML. En particular, los altos niveles de succinato proporcionaron evidencia de un efecto inhibitorio de <i>Saccharomyces bayanus</i> contra la FML espontánea.	44

FML: Fermentación maloláctica.

3.3.6. Cuantificación

Pese a que es todo un reto cuantificar en mezclas complejas; debido a la superposición de señales, está reportado un estudio para evaluar la reproducibilidad de la cuantificación mediante análisis con RMN obteniendo resultados satisfactorios.⁴⁵ Por otro lado efectuaron la comparación entre vinos auténticos y no identificables como auténticos por medio de la cuantificación de metabolitos.⁴⁶ Los estudios mencionados se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Estudios realizados mediante RMN aplicados a cuantificación.

Año	Aplicación	Ref.
2016	Realizaron un ensayo de colaboración con 15 laboratorios internacionales donde cuantificaron 6 compuestos, cinco presentes en el vino (glucosa, malato, acetato, fumarato y shikimato) y el sexto un conservador (sorbato). El valor de reproducibilidad HorRat estuvo entre 0,6 y 1,5 por lo tanto el ensayo fue reproducible.	45
2018	Compararon tres conjuntos de vinos auténticos con vinos sospechosos. Se realizó el análisis habitual del vino con diferentes técnicas y q-NMR. Se cuantificaron 33 metabolitos presentes en el vino. Este estudio demostró el potencial de q-NMR en la autenticación del vino mediante análisis comparativo con muestras auténticas.	46

3.4. Métodos de preparación de muestra.

Para poder realizar los estudios de RMN mencionados anteriormente fue necesario tener un método de preparación de muestra que permitiera observar los metabolitos de interés. En el caso del vino, los componentes mayoritarios son agua y etanol, por lo que los tratamientos de muestra se enfocan a disminuir o eliminar dichos compuestos. Con este fin en la literatura se han reportado principalmente cuatro métodos: i) el análisis directo, con el que se requiere que al momento de adquirir el espectro se realice con la presaturación de la señal del agua y opcionalmente la del etanol, ii) la liofilización, iii) la evaporación con nitrógeno y iv) la extracción en fase sólida.

Aunque el método más reportado es el análisis directo, hay un estudio en el que compara los métodos y concluye que el mejor método de preparación es la evaporación con N₂, debido al aumento de la sensibilidad con un corto tiempo de experimentación. Además, resalta las limitaciones en la detección de componentes minoritarios del vino del análisis directo y el largo tiempo de análisis de la liofilización.⁴⁷ Otro estudio realiza una comparación entre el análisis directo y la liofilización llegando a la conclusión de que la liofilización aumenta la sensibilidad.⁴⁸

En las siguientes secciones se describirán los fundamentos, los estudios realizados con dichos métodos y las condiciones experimentales reportadas.

3.4.1. Análisis directo

El análisis directo es el tratamiento de muestras de vino más reportado en la literatura, se ha utilizado en gran parte de los estudios mencionados en la sección de antecedentes

Tabla 7). Consiste en la adición de agua deuterada (D_2O) y un estándar interno al vino con o sin ajuste de pH. Para poder observar los compuestos minoritarios se realiza el experimento de 1H -RMN con la presaturación de la señal de agua, o con la presaturación de la señal de agua y las señales de etanol.

Para este método además de la supresión de señales, las variables a tomar en cuenta son: la proporción de vino: D_2O , el estándar interno y el ajuste de pH.

- En cuanto a la proporción de vino: D_2O , en la literatura se emplean: 90:10, 80:20 y 70:30, en todas ellas el vino va siempre en mayor cantidad para aumentar la concentración de metabolitos. De entre todas, como se puede ver en la Figura 6 la proporción más utilizadas es 90:10.

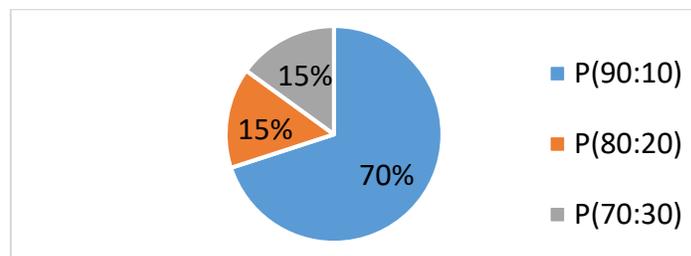


Figura 6. Proporciones de vino: D_2O usadas en la literatura para análisis directo. Los datos corresponden a los 16 artículos reportados en la Tabla 7.

- En cuanto al estándar interno se han utilizado TSP, DSS y ácido fórmico, siendo el primero el más utilizado.
- En cuanto al ajuste de pH, una variación mínima puede hacer que cambie el desplazamiento químico de las señales.⁴⁹ El pH de ajuste en los estudios de análisis directo varía de 3 a 4, y esto es debido a que la más alta capacidad amortiguadora del vino se encuentra en este intervalo, por la primera ionización de los ácidos tartárico y málico.⁵⁰

Las principales ventajas del análisis directo son que la muestra de vino no sufre alteraciones por manipulación de la muestra y tiene un corto tiempo de preparación y por tanto de análisis, es por esto que esta metodología es la más utilizada para estudios metabolómicos del vino por RMN. En la Tabla 7 se muestran las condiciones utilizadas en algunos estudios en los que se ha utilizado el análisis directo.

Tabla 7 Estudios del vino por RMN que utilizan análisis directo

Aplicación	Proporción (vino:D ₂ O)	Estándar interno	pH de ajuste	Supresión de señales	Ref.
Métodos de preparación	80:20	TSP	SA	Agua	47
Denominación de origen	91:9	DSS 1.5 %	SA	Agua	25
Monitoreo de fermentación	90:10	TSP 0.01%	3	Agua	42
Variedad de uva y efecto de sombreado	90:10	SE	SA	Agua	33
Calidad y denominación de origen	75:25	Ácido fórmico	SA	Agua	26
Añejamiento	91:9	TSP 0.1 %	SA	Agua	40
Caracterización de mezclas de vinos	80:20	DSS 0.06 M	4	Agua	51
Denominación de origen	90:10	TSP 0.58 mM	SA	Agua	24
Añejamiento-Denominación de origen	90:10	TSP 0.1 %	3.1	Agua y etanol	28
Variedad de uva	90:10	TSP 0.1%	3.1	Agua y etanol	34
Caracterización del vino	90:10	TSP 10 mM	3.2	Agua y etanol	36
Cuantificación	90:10	TSP 10 mM	3.1	Agua y etanol	45
Variedad de uva y añejamiento	90:10	SE	3.1	Agua	37
Clima, añejamiento y denominación de origen	90:10	TSP 0.1 %	3	Agua y etanol	41
Preparación de muestra	70:30	SE	3.5	Agua	48
Métodos de cuantificación	70:30	TSP 0.55mM y formiato de calcio 7.7 mM	3.1	Agua y etanol	46

*SA: Sin ajuste de pH, SE: Sin estándar interno

3.4.2. Liofilización

La liofilización es un proceso físico realizado para eliminar el disolvente (comúnmente agua) presente en una muestra mediante su sublimación (cambio de estado sólido a gaseoso). Se divide en tres etapas principales, congelamiento, secado primario y secado secundario.⁵²

- El congelamiento de la muestra se realiza para poder sublimar el agua; se debe llegar a la temperatura en la que ocurre la máxima solidificación con una velocidad óptima de enfriamiento, para obtener una estructura sólida uniforme sin líquido, para que el secado se lleve a cabo por sublimación en su totalidad.
- En el secado primario o sublimación se debe someter la muestra a condiciones de presión y temperatura menores a las del punto triple (620 milibar y 0.008 °C) ya que por debajo de este no existe la fase líquida; es por ello que este paso se realiza a temperaturas de -30 a -50 ° C y con ayuda de una cámara de alto vacío con presiones de 0.05 a 0.10 milibar. Además, a menor presión disminuye el punto de sublimación del hielo, lo que hace más eficiente el proceso.
- En el secado secundario o desorción se evapora el agua no congelable o ligada al subir la temperatura. Al terminar la liofilización queda una estructura porosa que puede ser reconstituida si se adiciona agua sin perder sus características originales.⁵³

Esta metodología se ha aplicado a muestras de vino para su análisis por RMN y tiene la ventaja de eliminar por completo el etanol y tener una mínima cantidad de agua remanente, aumentando así la sensibilidad del análisis. En la Tabla 8 se muestran algunos estudios en los que se aplica la liofilización.

Tabla 8 Estudios del vino por RMN que utilizan liofilización y reconstituyen con D₂O

Aplicación	Volumen liofilizado	Tiempo de liofilización	Estándar interno	Ajuste de pH	Supresión de señales	Ref.
Métodos de preparación	4 mL	28 h	SE	SA	Agua	47
Variedad de uva y denominación de origen	1 mL	-	DSS 5 mM	4	Agua	24
Denominación de origen/Terroir	1 mL	12 h	DSS 1.5 %	SA	Agua	25
Variedad de uva	1 mL	-	DSS 5 mM	4	Agua	32
Monitoreo de proceso de fermentación	1 mL	-	TSP 5 mM	4	Agua	43
Monitoreo de proceso de fermentación	1 mL	-	DSS	4	Agua	44
Variedad de uva	3 mL	48 h	DSS 0.5 %	4	Agua	38

*-No reportado, SE: sin estándar interno, SA: sin ajuste de pH.

3.4.3. Evaporación con N₂

El nitrógeno venteado directamente sobre un líquido reduce la presión parcial lo que acelera la evaporación y ayuda a eliminar el disolvente a medida que se evapora.⁵⁴ Esta metodología también se ha aplicado en muestras de vino y tiene la ventaja de concentrar la muestra en un corto periodo de tiempo. El estudio que realizó dicha metodología reporta una mejor identificación de compuestos minoritarios del vino como butilenglicol y alanina en comparación con análisis directo y liofilización.⁴⁷

3.4.4. Extracción en fase sólida

La EFS (Extracción en Fase Sólida) es un método de preparación de muestra que permite concentrar y separar componentes de interés de matrices líquidas mediante una fase estacionaria sólida, consiguiendo una mejora en la sensibilidad de análisis.

La técnica consiste en poner en contacto la muestra líquida con una fase sólida, en donde los compuestos son selectivamente adsorbidos en la superficie de la misma y posteriormente recuperados en el disolvente de elución. La fase sólida o adsorbente, suele estar empacada en cartuchos simulando una columna, en donde el solvente pasa a través de ella por medio de presión o vacío.

El procedimiento de EFS está constituido por cuatro pasos principales descritos a continuación:

- **Acondicionamiento:** el acondicionamiento del adsorbente se realiza para garantizar una interacción reproducible con el analito, produciendo un ambiente adecuado para su adsorción. Inicialmente ocurre la humectación de la fase, la cual permite extender y alinear las cadenas del polímero; posteriormente se pasan disolventes de composición similar a la matriz para tener mejor superficie de contacto con la solución acuosa a extraer.
- **Carga de la muestra:** la aplicación de la muestra se puede realizar con presión positiva o negativa, además, el flujo no debe ser demasiado rápido porque disminuye la interacción fase-analito.

- Lavado: este paso se realiza para eliminar interferencias, y que en la elución se obtengan solo los compuestos de interés. Se recomienda un tiempo de secado después del lavado en caso de que la diferencia de polaridad entre la solución de lavado y el eluyente sea muy grande, o bien si son inmiscibles.
- Elución: en este paso se recuperan los compuestos de interés con un solvente adecuado, este se selecciona con base en su fuerza de elución (determinada por su polaridad) y conforme al tipo de adsorbente. La velocidad de elución promedio es 1 mL / min; y el volumen de elución debe ser el mínimo posible dependiendo de las dimensiones del cartucho y la cantidad de adsorbente.

En los pasos de acondicionamiento y carga de muestra es esencial que la fase se mantenga humectada para evitar la entrada de aire a la columna.⁵⁵

Las principales variables en EFS son la elección del adsorbente y el disolvente de elución; dependiendo de las características fisicoquímicas de los compuestos de interés, para lograr una pre-concentración efectiva de la muestra y permitir una mejor detección e identificación de los componentes.

Los adsorbentes utilizados en EFS se clasifican comúnmente por la naturaleza de su mecanismo de interacción con el analito de interés, pueden ser fase normal, intercambio iónico y fase reversa.

- Fase normal: consiste en una adsorbente con grupos funcionales polares comúnmente unidos a grupos silanoles, cuyo objetivo es extraer compuestos polares de matrices poco polares, las interacciones que tiene con el analito son del tipo polar como enlaces de hidrógeno y dipolo-dipolo.
- Intercambio iónico: se basa en la interacción iónica de grupos catiónicos y aniónicos que al estar ionizados atraen compuestos con carga opuesta. Esta ionización es dependiente del pH.
- Fase reversa: la fase se constituye de grupos no polares, reteniendo por lo tanto, compuestos no polares de una matriz polar como el agua. Su interacción con los compuestos de interés se da por fuerzas de Vander Walls e interacciones π - π ,

en caso de compuestos aromáticos y fases poliméricas. Las fases reversas más utilizadas están compuestas de sílice unida a grupos alquilo como C18 o fases poliméricas.

La gran mayoría de los adsorbentes utilizados en fase normal y reversa están basados en grupos silanoles unidos a diferentes grupos funcionales para cambiar su polaridad, sin embargo tiene dos principales inconvenientes ya que es altamente sensible a pH y puede hidrolizarse con ciertos solventes. Para evitar estas desventajas se desarrollaron las fases poliméricas; estas se utilizan en fase reversa y están sintetizadas artificialmente.⁵⁶

Los adsorbentes poliméricos son muy hidrofóbicos, sus propiedades altamente adsorbentes surgen de la parte aromática que interactúa con analitos aromáticos mediante interacciones de enlaces π - π . Son más resistentes a solventes y pH extremos, tienen mayor superficie de contacto que la sílice y requieren menores volúmenes de disolvente de elución.

Existen una gran cantidad de fases poliméricas, entre ellas la de poliestireno divinil benceno (PS-DVB). Al ser una fase polimérica tiene la ventaja de no hidrolizarse cuando se somete a pH extremo. Es utilizada para retener compuestos hidrofóbicos con algunos grupos funcionales hidrofílicos, principalmente compuestos aromáticos y fenólicos de matrices acuosas. En la Figura 7 se muestra su estructura.

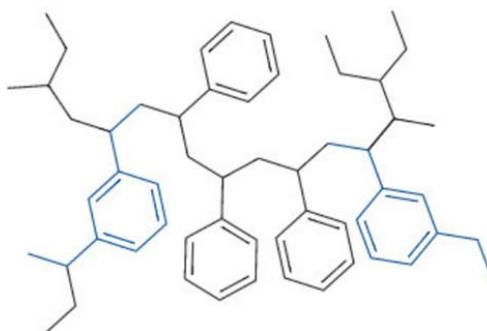


Figura 7. Estructura química del polímero poliestireno divinil benceno.

La extracción en fase sólida (EFS) se ha utilizado como método de preparación de muestras de vino, y el análisis del extracto se realiza principalmente por métodos

de separación acoplados a espectrometría de masas. Por ejemplo, un estudio se realizó por EFS con cartuchos de fase poliestireno divinil benceno para la pre-concentración de compuestos responsables del aroma del vino (principalmente terpenos y compuestos aromáticos), efectuando su identificación y cuantificación con cromatografía de gases.⁵⁷

Aunque lo más común es utilizar espectrometría de masas como método de análisis para muestras concentradas por EFS, hay un estudio que reporta su aplicación con RMN. Dicho trabajo, concentra los compuestos no polares presentes en el vino obteniendo mejor identificación y elucidación de compuestos (aromáticos y vinílicos). Al igual que el estudio anterior utiliza poliestireno divinil benceno como fase sólida.⁵⁸

4. Metodología

Esta sección describe la metodología utilizada para los métodos reportados en la literatura, análisis directo, liofilización, evaporación con N₂ y extracción en fase sólida.

4.1. Muestras

Las muestras fueron botellas comerciales de vino mexicano cuya información se encuentra resumida en la Tabla 9.

Tabla 9 Información de los vinos utilizados

Tipo de vino	Variedad de uva	Casa Productora	Año	Origen	% Alcohol
Tinto	Barbera	Santo Tomás	2015	Valle de Santo Tomás	14
Tinto	Nebbiolo	La Cetto	2016	Valle de Guadalupe	13.7
Tinto	Zinfandel	La Cetto	2016	Valle de Guadalupe	13.5
Tinto	Merlot	La Cetto	2017	Valle de Guadalupe	13
Tino	Petit Sirah	La Cetto	2016	Valle de Guadalupe	13.8
Tinto	Cabernet Sauvignon	La Cetto	2017	Valle de Guadalupe	13
Blanco	Blanc de Zinfandel	La Cetto	–	Valle de Guadalupe	11.5
Blanco	Blanc de Blancs	La Cetto	–	Valle de Guadalupe	12

4.2. Análisis directo

En el método de análisis directo, el vino se analizó al momento de abrir la botella. Primero se transfirieron 900 µL de vino a un criovial (estéril, 2 mL, T309-2A, Simport) y se le adicionaron 100 µL de buffer de fosfatos con TSP (Sigma-Aldrich, 98 %) como estándar interno (1 M de KH₂PO₄ con TSP al 0.1 % en D₂O a pH de 3.1). Posteriormente se ajustó el pH a 3.1 con una Unidad de titulación de pH “BTpH” (Bruker) y finalmente se transfirieron 600 µL de la mezcla a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

4.3. Liofilización

Para la prueba de liofilización se congelaron 2 mL de vino y se liofilizaron durante 48 horas (temperatura del colector -50 °C, presión 0.101 milibar, liofilizadora de árbol, marca: Labconco, modelo: 2.5). La muestra liofilizada se reconstituyó con 800 µL de D₂O, se filtró con acrodiscos de nylon (0.45 µm, 13 mm diámetro, Millex-HN, Merck) y se transfirieron 600 µL a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

El tiempo de liofilización se eligió acorde con lo reportado, ya que incluso después de 48 h no se logra eliminar el agua de la muestra.⁵⁹

4.4. Evaporación con nitrógeno

En el método de evaporación se transfirieron 2 mL de vino a un vial de 10 mL, con el fin de tener la mayor superficie de contacto, y la muestra se evaporó con flujo de N₂ durante aproximadamente 5 horas. El residuo se reconstituyó con 800 µL de D₂O, se filtró con acrodiscos de nylon (0.45 µm, 13 mm diámetro, Millex-HN, Merck) y se transfirieron 600 µL a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

4.5. Extracción en fase sólida

4.5.1. Procedimientos

Se probaron dos metodologías de extracción,^{57,58} con el objetivo de seleccionar la que extrajera el mayor número de metabolitos sin alteración y con un tiempo adecuado de experimentación. Las condiciones de estas metodologías se muestran en la Figura 8.

	Metodología 1	Metodología 2
Fase	200 mg de poliestireno divinil benceno	500 mg de poliestireno divinil benceno
Acondicionamiento	5 mL de metanol, 5 mL de agua	10 mL de DCM , 5 mL de etanol , 10 mL de etanol/ agua al 10 %
Volumen de muestra	10 mL de vino	100 mL de vino
Disolvente de elución	3 mL de Metanol con 5 % de MeOD-d ₄ y TSP al 0.024 %	10 mL de Diclorometano
Evaporación/ Disolvente de reconstitución	No /ninguno	Si / Cloroformo deuterado

Figura 8. Metodologías utilizadas en la optimización de EFS.^{57, 58}

4.5.2. Optimización

Para optimizar la metodología de EFS se evaluaron los siguientes parámetros: cantidad de adsorbente (200 y 500 mg), volumen de muestra (20, 30 y 40 mL), disolvente de elución (metanol y diclorometano) y disolvente de reconstitución del extracto evaporado a sequedad (CDCl₃ y MeOD-d₄).

4.5.2.1. Procedimiento optimizado

Para la metodología optimizada de EFS se utilizaron cartuchos de 6 mL con 200 mg de poliestireno-divinilbenceno como adsorbente (Chromabond HR-P, Macherey-Nagel); se acondicionaron con 5 mL de metanol (grado HPLC, 99.9% Sigma-Aldrich), 3 mL de etanol (grado HPLC, 99.5% Sigma-Aldrich) y 5 mL de una solución de etanol al 10 % v/v en agua desionizada. Posteriormente se cargaron 40 mL de muestra y se lavó el cartucho con 20 mL de agua desionizada. Se eluyó con 5 mL de metanol, se evaporó el extracto a sequedad con N₂ y se reconstituyó con 700 µL de MeOD-d₄ (Sigma Aldrich, 99.8 % D) con TSP (sigma aldrich 98 %) al 0.024 % m/m, transfiriendo 620 µL del extracto reconstituido a un tubo de tubo de RMN de 5 mm (Figura 9).

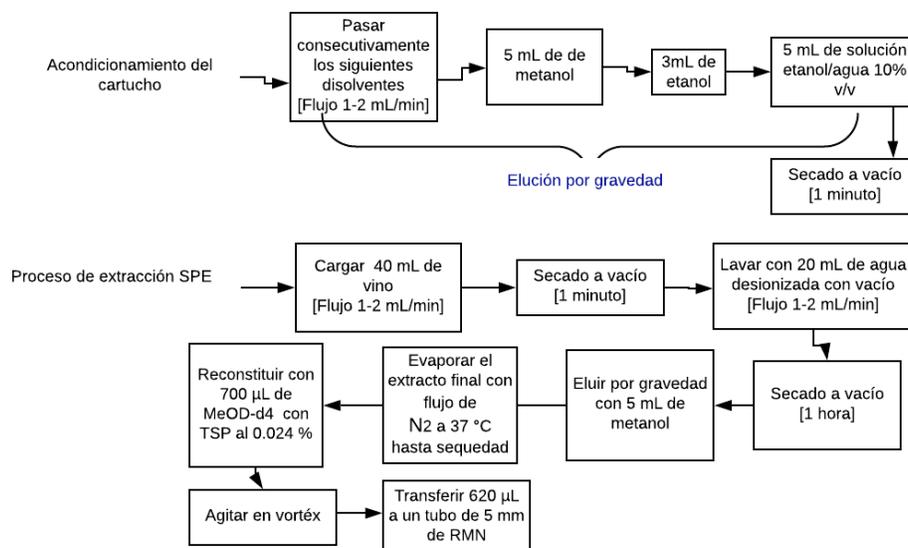


Figura 9. Procedimiento optimizado para el método de extracción en fase sólida.

4.6. Adquisición de los experimentos de RMN

Todos los experimentos fueron adquiridos de manera automática con el software IconNMR (Bruker); a 300 K en un espectrómetro Bruker Avance III HD de 16.44 T, (frecuencia para ^1H 699.96 MHz) equipado con una sonda criogénica de triple sintonía con bobina de gradientes en el eje Z para tubos de 5 mm y un muestreador automático “Sample Jet”.

La secuencia de pulsos y los parámetros seleccionados fueron distintos dependiendo del método de preparación de muestra utilizado (Tabla 10).

Tabla 10 Parámetros y condiciones de adquisición de experimentos de RMN

Tratamiento	Experimento/ secuencia	Supresión de señales	Parámetros	Disolvente
1. Análisis directo	^1H con presaturación /noesygppszzgpr1d	H_2O y EtOH	D1:4 s, AQ:2.32 s, NS:32, DS:4, SW:14097 Hz, RG:16.0	D_2O
2. Liofilización	^1H con presaturación /noesygprr1d	H_2O	D1:4 s, AQ:2.22 s, NS:32 DS:4, SW:14705 Hz, RG:16.0	D_2O
3. Evaporación con nitrógeno	^1H con presaturación /noesygprr1d	H_2O	D1:4 s, AQ:2.22 s, NS:32, DS:4, SW:140705 Hz, RG:14	D_2O
4. Extracción en fase sólida	^1H	N/A	D1:2 s, AQ:2.32 s, NS:32, DS:2, SW:14097 Hz, RG: 8	MeOD- d_4

D1: Tiempo de relajación, AQ: Tiempo de adquisición, NS: Número de transientes, DS: Número de transientes ficticios, SW: Ventana espectral y RG: Ganancia.

4.6.1. Procesamiento

El procesamiento de los espectros se realizó en los programas MestReNova (versión 12.0.0, Mestrelab Research S.L. 2017) y TopSpin (versión 3.5, Bruker). Se corrigió la fase y se ajustó la línea base de forma manual. Los espectros adquiridos en D₂O se referenciaron a la señal de TSP (0.0 ppm) y los de MeOD-d₄ a la señal residual del disolvente (3.3 ppm).

4.7. Identificación de metabolitos

Para la identificación de metabolitos se utilizó el software de reconocimiento de patrones Chenomx (versión 8.3) y experimentos bidimensionales COSY, HSQC y HMBC.

5. Resultados y discusión.

En el presente capítulo se muestran los espectros típicos de una muestra de vino adquiridos sin presaturación, con presaturación del agua, y con presaturación del agua y del etanol. En dichos espectros se indican los δ de ^1H de las principales señales. Posteriormente se muestran los espectros de las muestras adquiridos tras las diferentes metodologías probadas.

5.1. Espectros de RMN del vino

Como se mencionó en los antecedentes, los experimentos empleados en la literatura para el análisis directo de vino tienen dos variantes; algunos estudios realizan únicamente la supresión de la señal de agua mientras que otros suprimen tanto la señal de agua como la de etanol; no obstante, en nuestro caso fue necesario realizar la supresión de ambos disolventes.

En la Figura 10 se muestra el espectro de una muestra de vino sin supresión de la señal de agua; las únicas señales que se pueden observar son las señales de los compuestos mayoritarios, agua en 4.8 ppm, y las del etanol en 3.5 ppm (cuarteto) y 1.1 ppm (triplete).

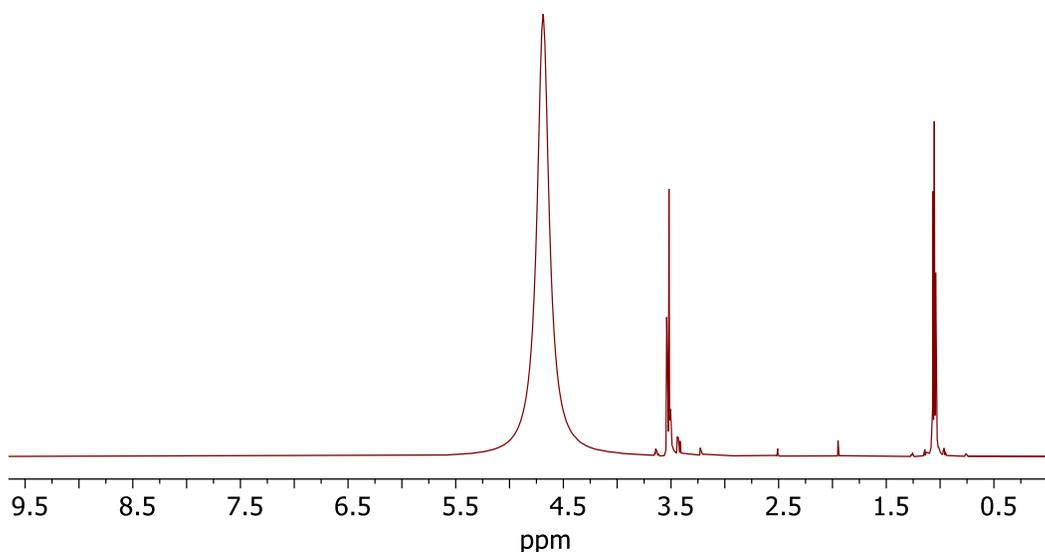


Figura 10. Espectro ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25 °C) de una muestra de vino.

Por consiguiente, para aumentar la sensibilidad y poder observar los metabolitos minoritarios se utiliza una secuencia de pulsos que suprime la señal de agua, que es la más intensa. En la Figura 11A se muestra el espectro resultante y al aumentar la intensidad ya se pueden ver otros metabolitos (Figura 11B), sin embargo, como el equipo utilizado en esta tesis es un espectrómetro de 700 MHz con criosonda, que le da alta sensibilidad, y la concentración de etanol es muy alta, se producen artefactos (señales negativas de intermodulación entre las dos grandes señales del etanol) que se observan claramente en las expansiones de la Figura 11B, por lo que es imprescindible suprimir además del agua, el cuarteto y/o el triplete del etanol para obtener un espectro libre de distorsiones.

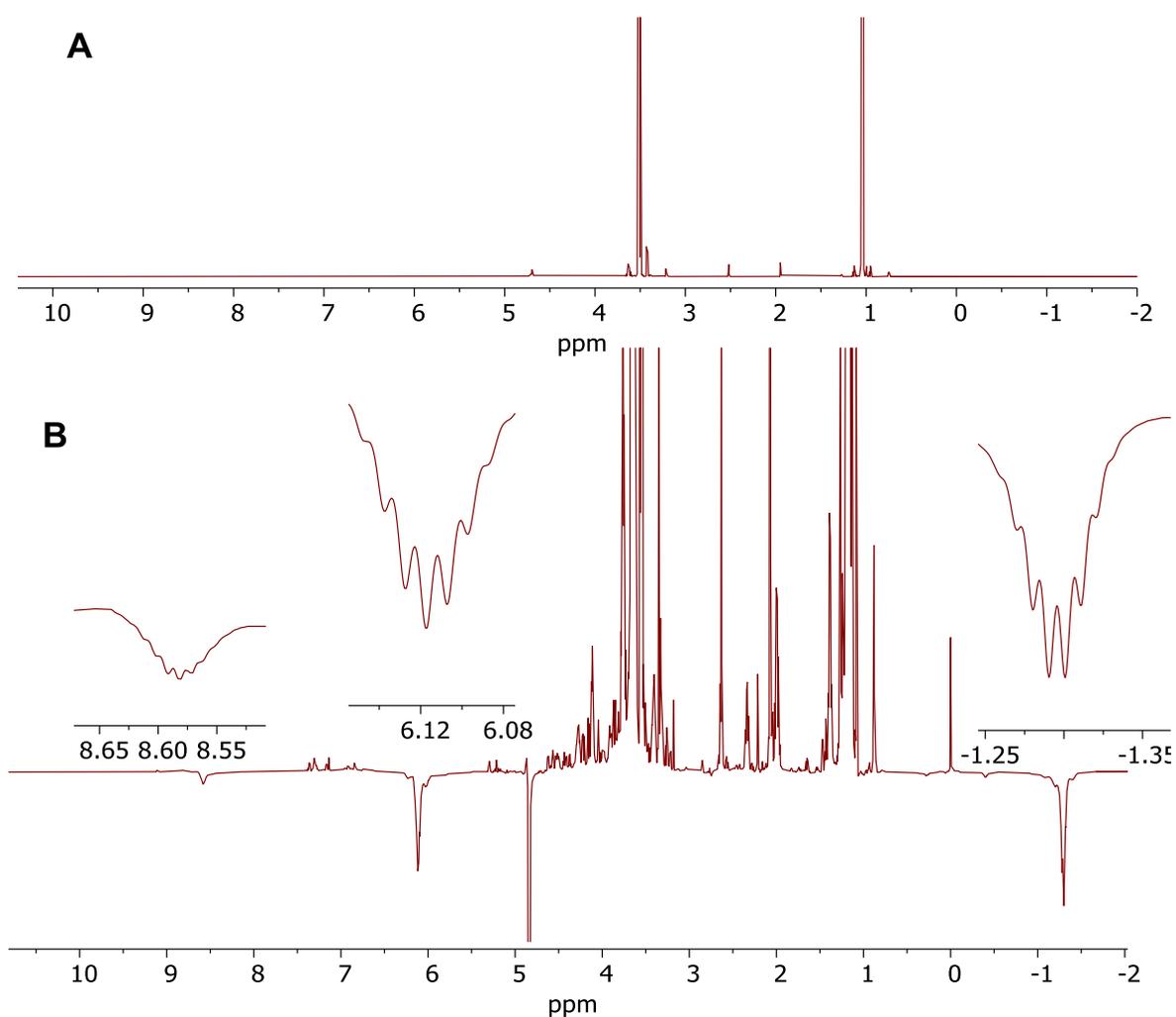


Figura 11. A: Espectro $^1\text{H-RMN}$ (700 MHz, D_2O , 25 $^\circ\text{C}$) con supresión de H_2O de una muestra de vino. B: mismo espectro A con intensidad incrementada y con ampliaciones de las regiones con artefactos.

Después de probar algunas secuencias para suprimir también las señales del etanol, seleccionamos la supresión con un pulso con forma para suprimir las ocho señales correspondientes al agua y etanol (una simple al agua y siete líneas individuales correspondientes al cuarteto y triple del etanol).⁶⁰ El resultado es un espectro con las señales del etanol atenuadas y sin distorsiones como se observa en el espectro de la Figura 12. El experimento consiste en la secuencia de pulsos que realiza la supresión de las señales de H₂O y etanol (librería de Bruker “*noesygpps1d*”). Un pulso con forma se aplica durante el tiempo de relajación con frecuencias en el espectro para 8 bandas individuales, y así lograr la supresión simultánea y altamente selectiva de la señal simple del agua y siete líneas individuales correspondientes al cuarteto y señal triple del etanol.

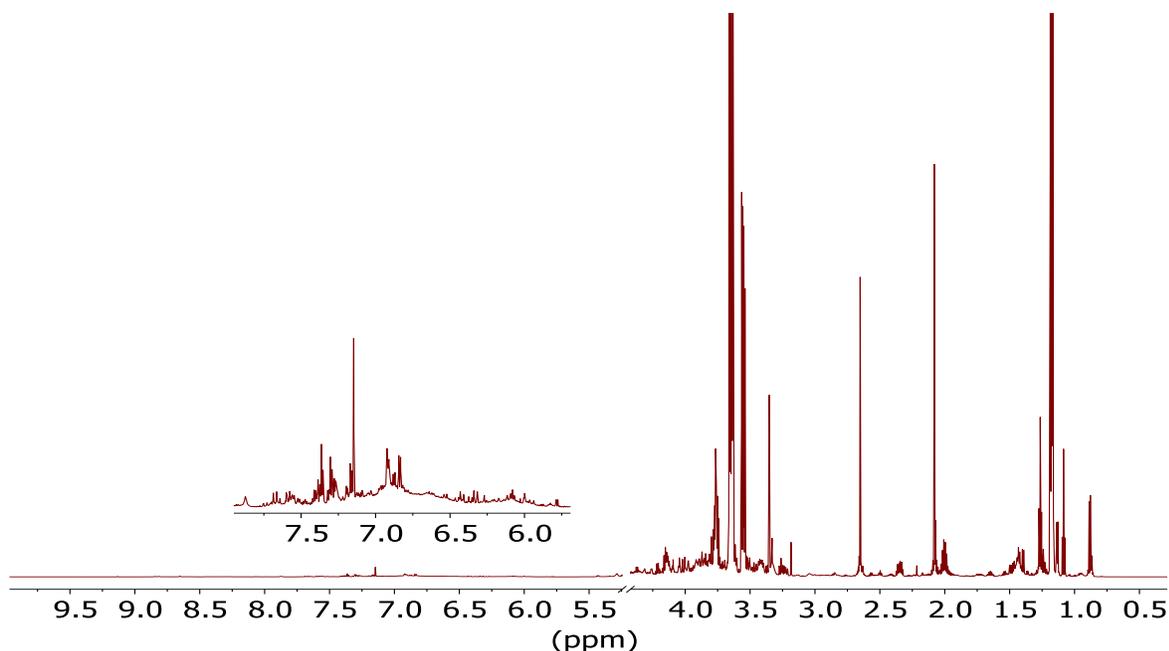


Figura 12. Espectro ¹H-RMN (700 MHz, D₂O, 25 °C) con supresión de las señales de agua y etanol de una muestra de vino.

5.1.1. Identificación de metabolitos en análisis directo

Para conocer el perfil metabólico de muestras de vino blanco y tinto cuando la metodología de preparación es el análisis directo se realizó la identificación de los metabolitos presentes en los espectros de las muestras de ambos tipos de vino. Los

espectros con los metabolitos identificados se pueden ver en la Figura 13 y Figura 14 los cuales se marcaron en el espectro con diferentes colores para una mejor visualización. Los metabolitos identificados, sus desplazamientos químicos y multiplicidad se enlistan en la Tabla 11.

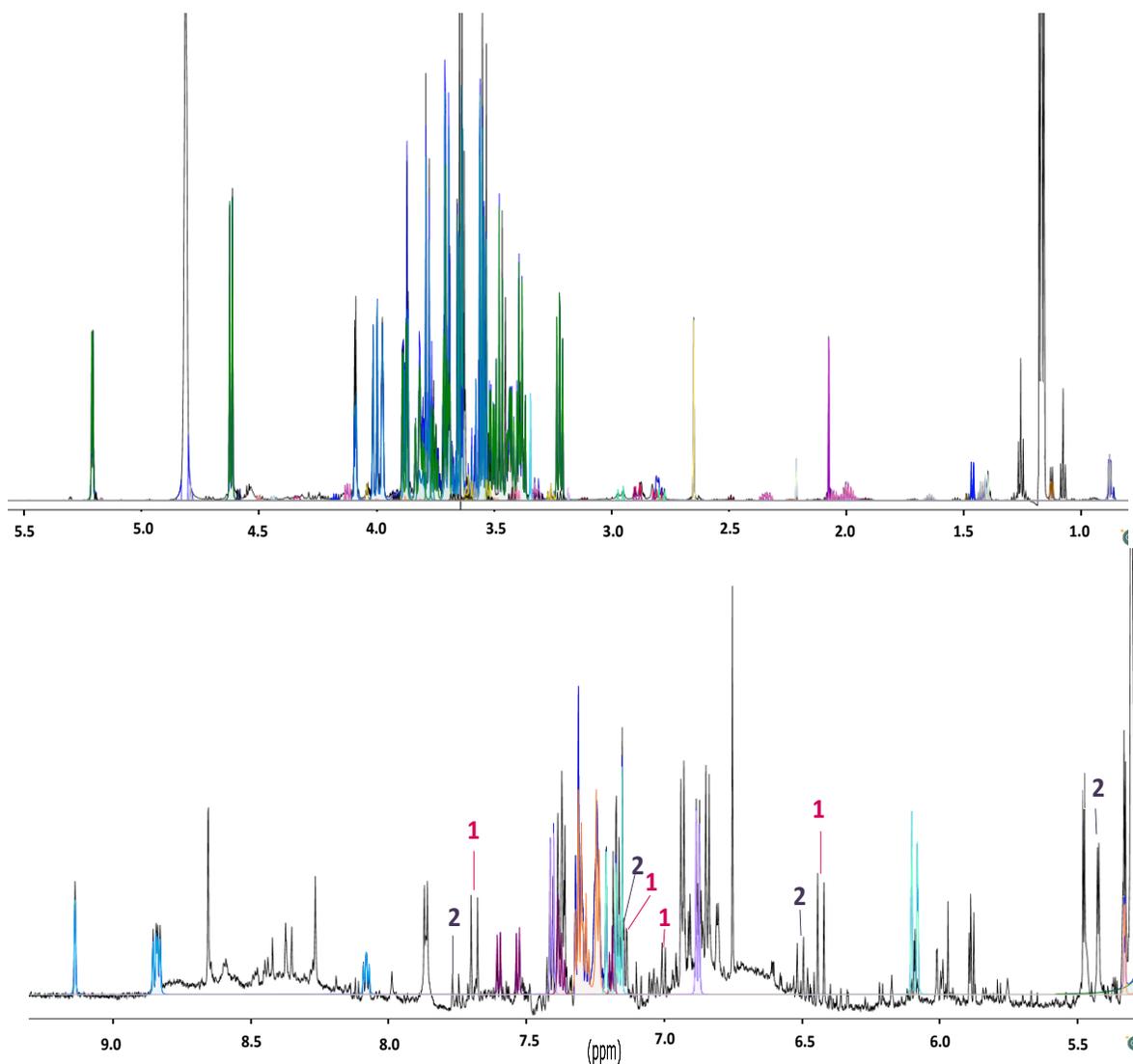


Figura 13. Espectro ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C) en una muestra de vino blanco por análisis directo. La identificación de los metabolitos se presenta con diferentes colores: **1) Ácido cafeico**, **2) ácido caftárico**, **4-aminobutirato**, **ácido acético**, **ácido láctico**, **ácido málico**, **alanina**, **fructosa**, **valina**, **glucosa**, **prolina**, **glicerol**, **2-feniletanol**, **arabinosa**, **acetoina**, **alcohol isoamílico**, **Mioinositol**, **Colina**, **Metanol**, **Epicatequina**, **ácido succínico**, **trigonelina**, **ácido cítrico**, **triptófano**, **tirosina**, **y ácido tartárico**.

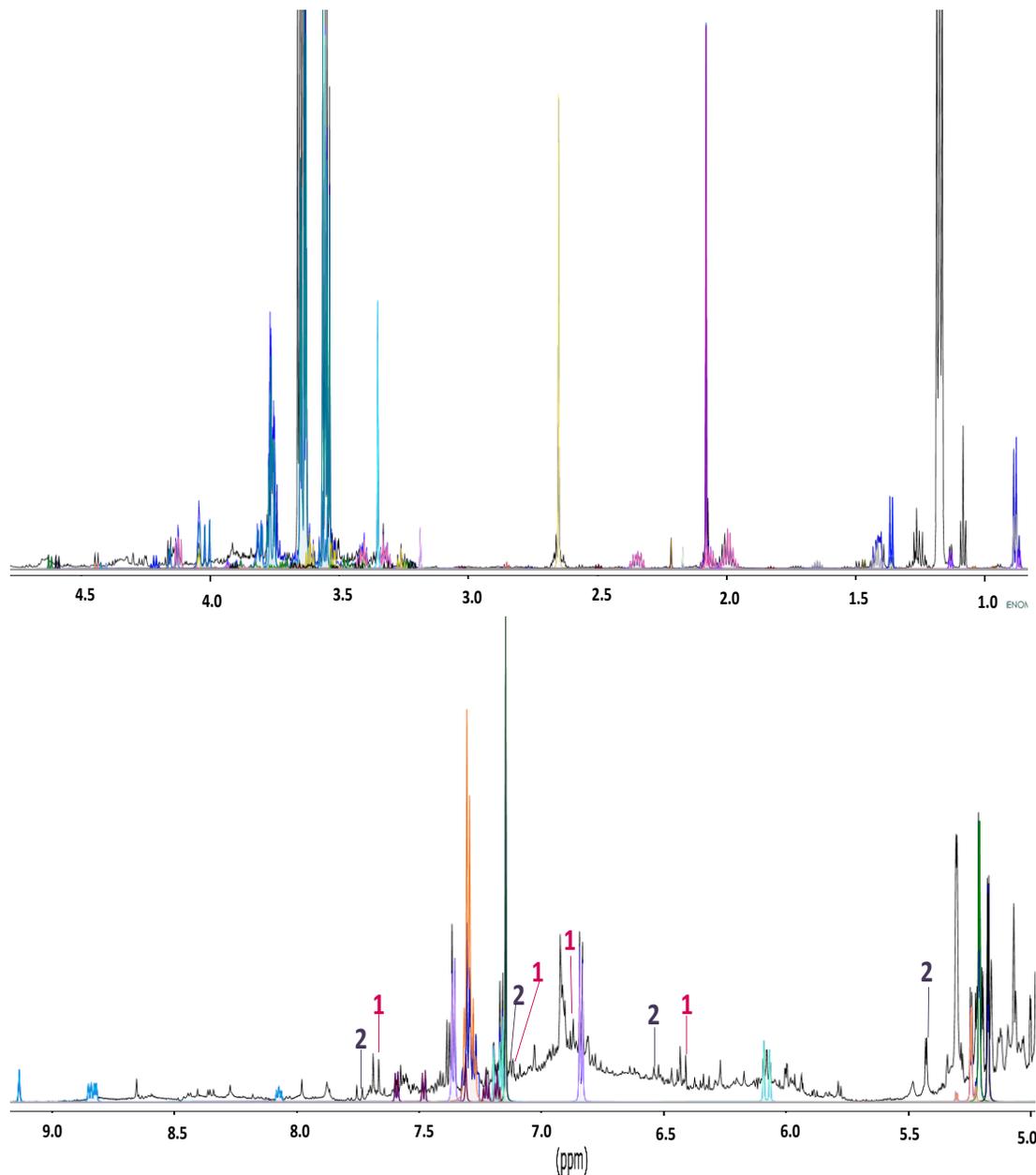


Figura 14. Espectro ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C) de una muestra de vino tinto por análisis directo. La identificación de los metabolitos se presenta con diferentes colores: **1) ácido cafeíco**, **2) ácido caftárico** 4-aminobutirato, ácido acético, ácido láctico, ácido gálico, ácido pirúvico, alanina, fructosa, valina, glucosa, prolina, glicerol, 2-feniletanol, arabinosa, acetoina, alcohol isoamílico, mioinositol, colina, metanol, epicatequina, ácido succínico, trigonelina, triptófano, tirosina, ácido tartárico y xilosa.

Tabla 11 Compuestos identificados en las muestras de análisis directo.

Número	Compuesto	δ (Multiplicidad, constante acoplamiento, asignación)
1	Ácido cafeico	6.42 (d, $J = 15.9$ Hz, CH), 6.88 (d, $J = 8.2$ Hz, CH), 7.12 (d, $J = 2.0$ Hz, CH), 7.68 (d, $J = 16.0$ Hz, CH)
2	Ácido caftárico	5.42 (d, $J = 3.5$ Hz, CH), 6.46 (d, $J = 15.9$ Hz CH), 7.13 (d, $J = 2.0$ Hz, CH), 7.74 (d, $J = 15.9$ Hz CH)
3	4-Aminobutirato	1.83 (q, CH ₂), 2.50 (t, $J = 7.4$ Hz, CH ₂)
4	Ácido acético	2.08 (s, CH ₃)
5	Ácido láctico	1.36 (d, $J = 7.0$ Hz, CH ₃), 4.21 (q, $J = 7.2$ Hz, CH)
6	Ácido gálico	7.15(s, CH)
7	Ácido pirúvico	2.21(s, CH ₃)
8	Ácido málico	2.81 (dd, CH), 2.89 (dd, $J = 16.3, 4.4$ Hz, CH)
9	Alanina	1.49 (d,7.2, CH ₃)
10	Fructosa	4.00 (d, $J = 1.3$ Hz, CH), 4.02 (d, $J = 1.4$ Hz, CH),
11	*Valina	0.99 (d, $J = 7.2$ Hz), 1.04 (d, $J = 7.2$ Hz)
12	Glucosa	4.62(d, $J = 7.9$ Hz CH), 5.30 (d, $J = 3.7$ Hz, CH)
13	Prolina	2.00 (m, CH ₂), 2.34(m, CH),
14	Glicerol	3.55 (dd, $J = 11.7, 6.5$, CH ₂), 3.82(m) CH
15	Alcohol fenético	7.15 (m, CH), 7.20 (m, CH), 7.24 (m, CH)
16	Arabinosa	5.24 (d, $J = 4.6$ Hz)
17	Alcohol isoamílico	0.92(d, $J=6.8$ Hz, CH ₃), 1.62(m, CH)
18	Acetoina	2.16(s, CH ₃), 1.32 (d, $J = 6.6$ Hz, CH ₃)
19	Colina	3.18(s, CH ₃)
20	Triptófano	7.53 (d, $J = 8.6$ Hz, CH), 7.60 (d, $J = 8.6$ Hz)
21	Metanol	3.35(s, CH ₃)
22	Epicatequina	6.07 (d, $J = 2.2$ Hz, CH), 6.09 (d, $J = 2.2$ Hz, CH)
23	Ácido succínico	2.65(s, CH ₂)
24	Trigonelina	4.43(s, CH ₃), 8.08(m, CH), 8.84(m, CH) 9.14(s, CH)
25	Ácido cítrico	2.96 (d, $J = 15.6$ Hz, CH)
26	Mioinositol	3.26(t, $J = 9.4$ Hz, CH)
27	Tirosina	6.84(m, CH), 7.17(m, CH)
28	Ácido tartárico	4.38(s, CH)
29	Xilosa	5.17 (d, $J = 3.8$ Hz, CH)

En la Figura 15 se muestran 8 espectros apilados de los vinos blancos y tintos de diferente variedad de uva adquiridos con el método de análisis directo, en general se puede ver que en la región de 0-5 ppm la intensidad de las señales es mayor que las de la zona aromática (6-7 ppm). En cuanto a la diferencia entre vinos blancos y tintos es notorio que en los primeros hay mayor intensidad de las señales en la zona de los

azúcares (3-5 ppm), claramente se puede ver que la señal del protón anomérico de la glucosa (5.21 ppm), el ácido cítrico (2.96 y 2.78 ppm) y el ácido málico (2.89 y 2.80 ppm) tienen una mayor intensidad en las muestras de vinos blancos. En el caso del ácido málico esto puede deberse a que en los vinos tintos puede o no llevarse a cabo la fermentación maloláctica.

Por otra parte los vinos tintos tienen una mayor intensidad y cantidad de señales en la zona aromática (6.00-8.00 ppm).

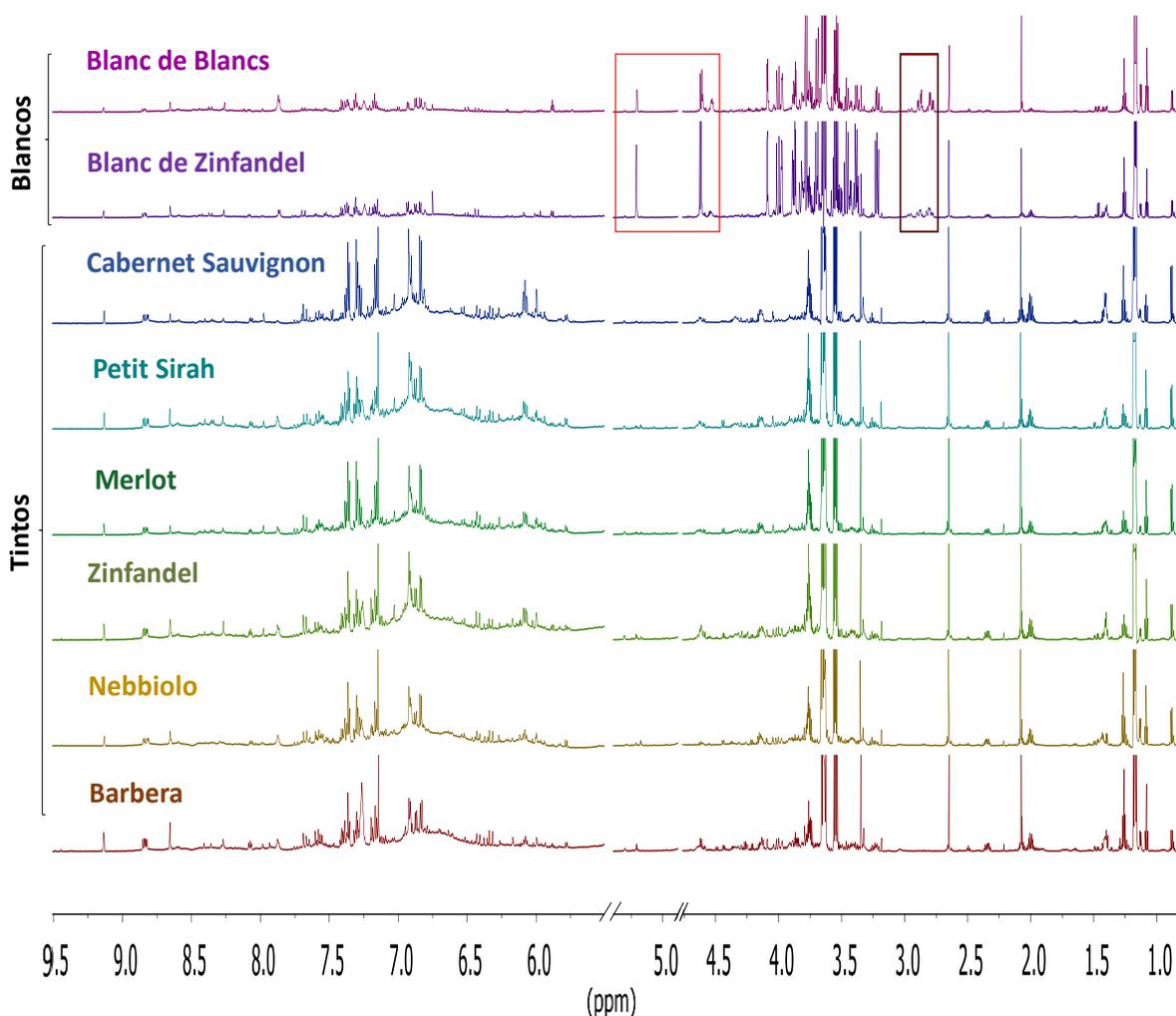


Figura 15. Espectros apilados ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C) de las muestras de vino preparadas con análisis directo. Todos los espectros se normalizaron con respecto a la señal de TSP. En la región de 5.6-9.4 ppm se aumentó la intensidad ocho veces con respecto al resto del espectro. En recuadros están indicadas las señales de los protones anómicos de azúcares (4.6-5.3 ppm) y el ácido málico (3.0 ppm).

5.2. Espectros tras la evaporación con N_2

Durante el proceso de evaporación con N_2 se eliminó por completo el etanol pero no el agua debido a la formación de una solución viscosa, probablemente por el contenido de azúcares que no permite llevar a sequedad la muestra (Figura 16). Por lo tanto, al reconstituir el concentrado con D_2O se obtuvo una suspensión que se filtró con un acrodisco de nylon de $0.45 \mu m$.



Figura 16. Muestra de vino tinto evaporada con N_2

En la Figura 17 se muestran los espectros superpuestos de dos muestras de vino tinto Cabernet Sauvignon, una evaporada con N_2 y otra por análisis directo; se puede observar que hay una pérdida de los siguientes metabolitos en la muestra evaporada: alcohol isoamílico, metanol, alcohol fenético, un compuesto no identificado en 4.6 ppm y varios compuestos hasta el momento no identificados en la región de 6.0-8.0 ppm, además hay una disminución en la intensidad de ácido acético y ácido succínico. La pérdida y disminución de los metabolitos anteriores se debe probablemente a que algunos de ellos son volátiles, y otros poco solubles en agua por lo que se tuvo una pérdida total o parcial en el vidrio del recipiente al no disolverse por completo con la reconstitución.

Lo anterior es un inconveniente de la evaporación con N_2 por lo que se decidió no analizar más muestras con este tratamiento.

6X

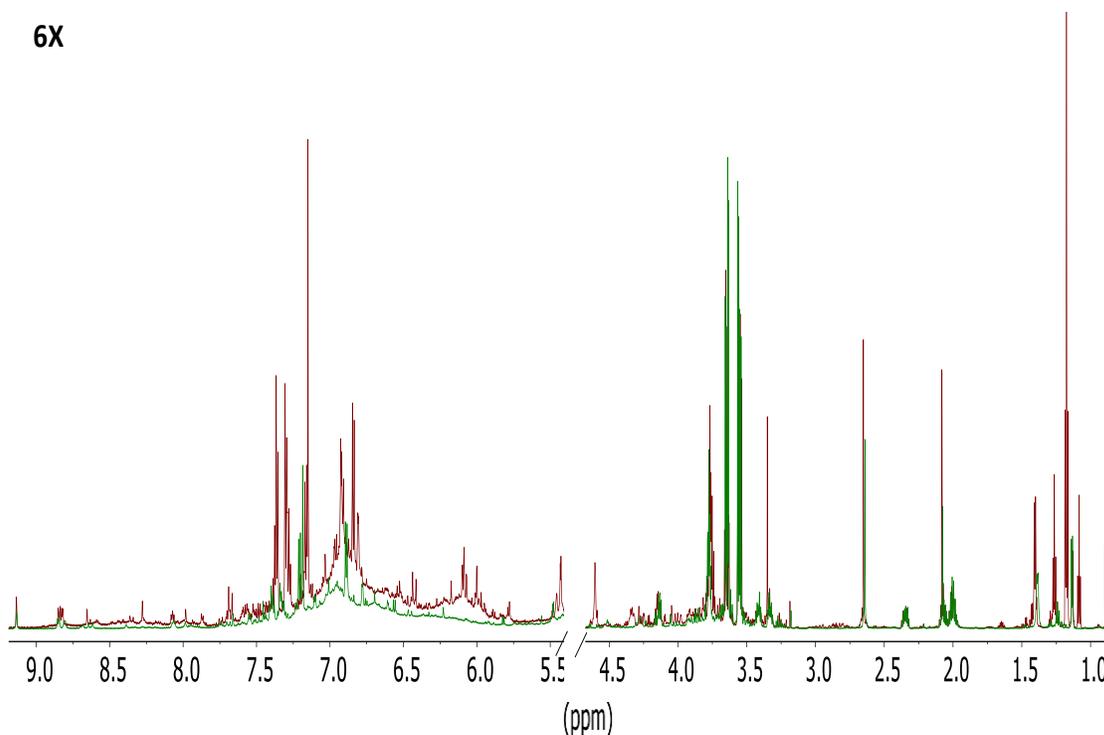


Figura 17. Espectros superpuestos ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25 °C) de una muestras de vino tinto preparada por dos metodos, una evaporada con N_2 (verde) y otra por análisis directo (marrón). En la región de 5.5-9.0 ppm se aumentó la intensidad seis veces. Los espectros se normalizaron a la señal del glicerol (3.55 ppm).

5.3. Espectros tras la liofilización

En la Figura 18 se muestran los espectros superpuestos de muestras de vino tinto Cabernet Sauvignon, adquiridos tras liofilizar la muestra y el otro por análisis directo. Al analizar los espectros se encontraron varias desventajas. Por una parte el agua y el etanol no se eliminan por completo, aunque esto se compensó adquiriendo el espectro con supresión de la señal de agua. Además, al igual que con la evaporación se perdieron algunos metabolitos como alcohol isoamílico, metanol, alcohol fenético, ácido acético, y un compuesto no identificado en 4.6 ppm.

El realizar la liofilización requiere un tiempo total de análisis mayor a 48 horas. Por consiguiente, debido a la disminución en la intensidad de las señales antes mencionadas, el agua residual y el largo tiempo de análisis se decidió no realizar más muestras con este tratamiento.

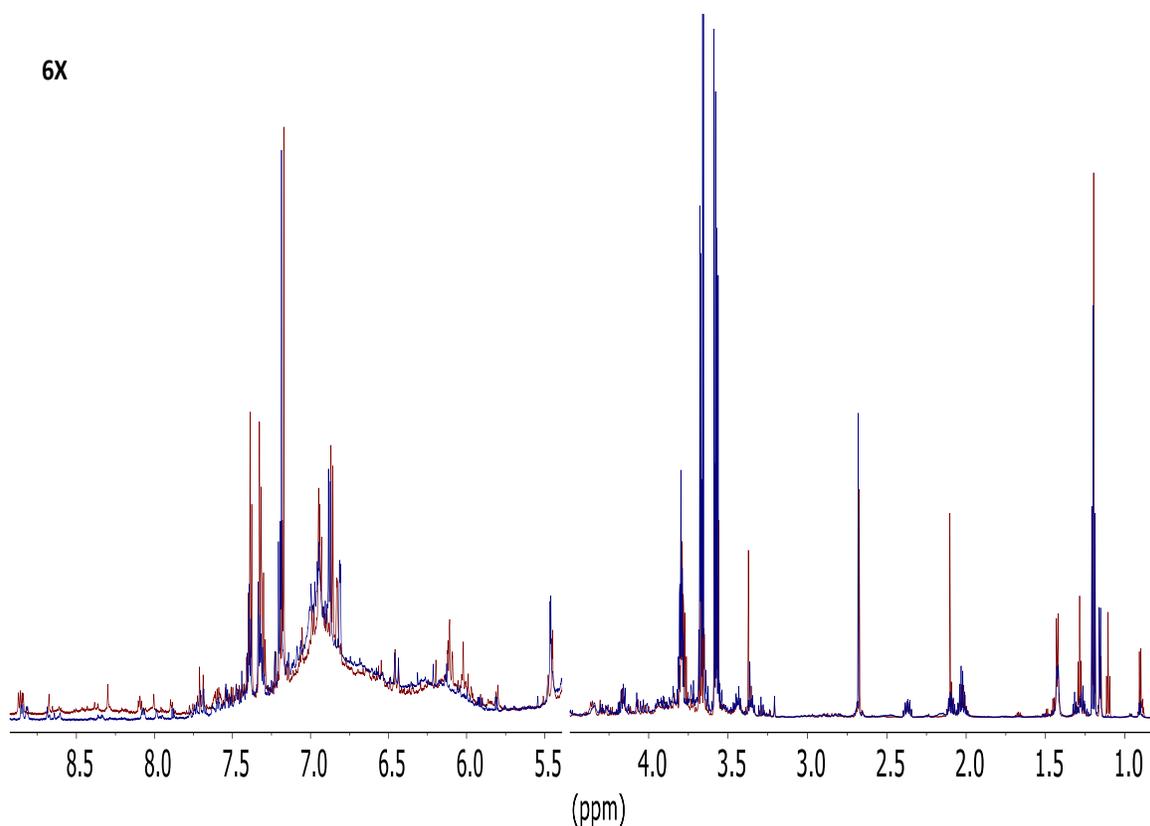


Figura 18. Espectros superpuestos ^1H -RMN (700 MHz, D_2O , 25°C) de muestras de vino tinto una liofilizada (azul) y la otra preparada por análisis directo (marrón). En la región de 5.5-8.5 se aumentó la intensidad seis veces. Los espectros se normalizaron a la señal del glicerol (3.55 ppm).

5.4. Espectros tras la extracción en fase sólida

5.4.1. Selección del procedimiento.

Se probaron dos metodologías que utilizan cartuchos con fase poliestireno-divinilbenceno.^{57 58} Al comparar los espectros de los extractos (Figura 19), se observó que se obtienen los mismos metabolitos en diferentes concentraciones. En la metodología 1 la concentración de los metabolitos es más baja que la metodología 2 debido al menor volumen de muestra, no obstante, esta última tiene un tiempo de preparación cuatro veces mayor que el método 1. Por lo tanto, se decidió hacer una optimización para aumentar el número de metabolitos observables en un menor tiempo de análisis.

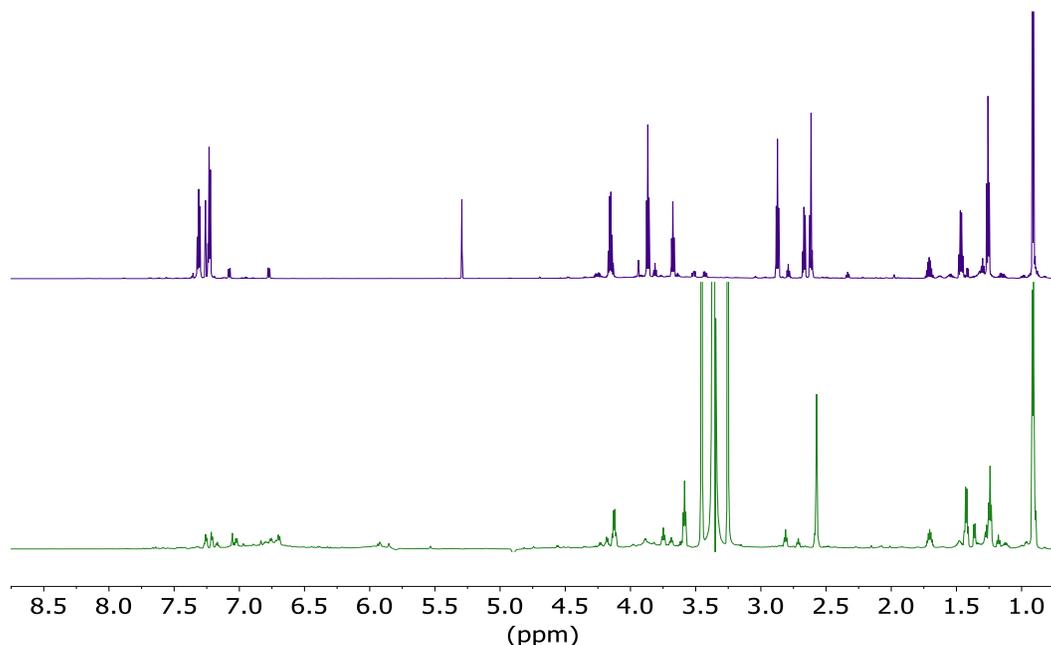


Figura 19. Espectros apilados ^1H -RMN (700 MHz, 25°C) de los extractos de vino de la variedad de uva Cabernet Sauvignon preparadas mediante las metodologías de EFS 1 (verde, 10 ml vino, MeOD- d_4) y 2 (Morado, 100 ml de vino, CDCl_3). Para el espectro de la metodología 1 se suprimió la señal de metanol. Espectro normalizado a la señal de alcohol isoamílico.

5.4.2. Optimización de la metodología

La optimización se realizó para establecer la cantidad de adsorbente, volumen de muestra y, definir el mejor disolvente de elución y de reconstitución.

5.4.2.1. Cantidad de adsorbente y volumen de muestra

Para tener un volumen de muestra y tiempo de experimentación intermedios entre las metodologías probadas anteriormente, se decidió establecer como cantidad de adsorbente 200 mg de fase utilizando cartuchos de 6 mL. Posteriormente se realizaron extracciones con 20, 30 y 40 mL de vino con las siguientes condiciones:

- Acondicionamiento: 5 mL de DCM, 5 mL de etanol, 5 mL de etanol al 10% (v/v) en agua.
- Disolvente de elución: DCM.
- Evaporación/Disolvente de reconstitución: A sequedad / MeOD- d_4 .

En la Figura 20 se muestran los espectros de los extractos obtenidos con los diferentes volúmenes de muestra. En el extracto A se puede observar que la intensidad relativa de los metabolitos es considerablemente menor que en los extractos B y C, por lo que se descartó el volumen de muestra de 20 mL. En los extractos B y C la intensidad relativa de estos es muy similar, observándose ligeramente mejor en el espectro C (correspondiente a 40 mL) por lo que fue el volumen seleccionado.

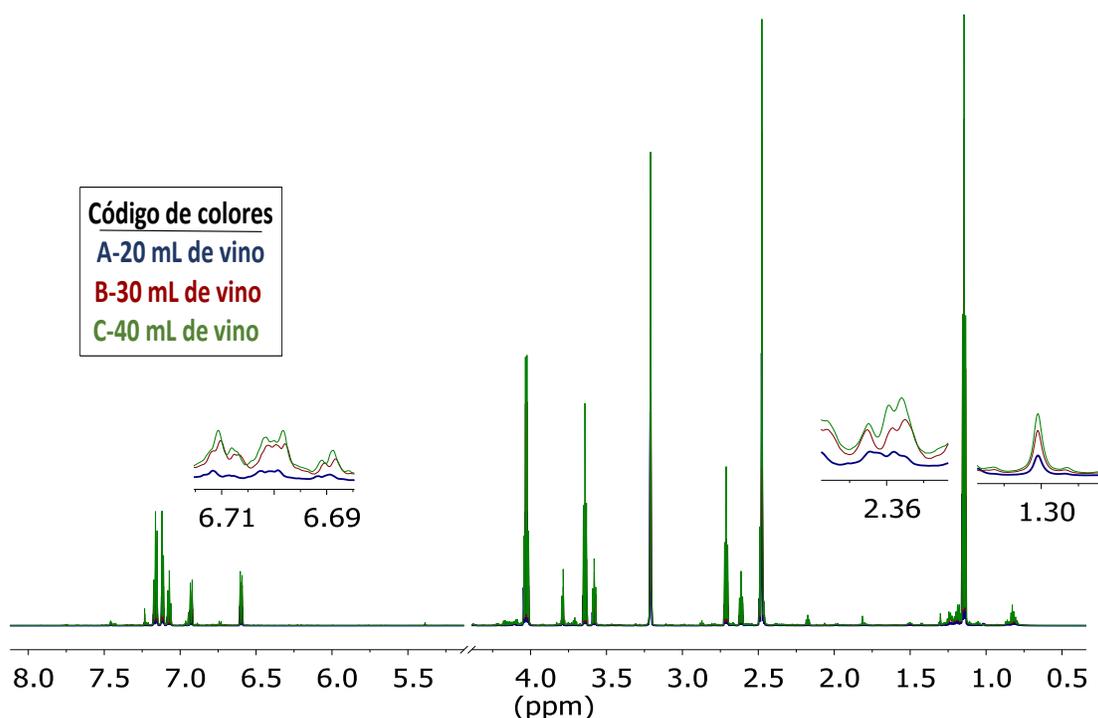


Figura 20. Espectros superpuestos ^1H -RMN (700 MHz, MeOD- d_4 , 25°C) de las muestras de vino preparadas con EFS utilizando diferentes volúmenes de vino: 20 mL (Azul), 30 mL (Marrón) y 40 mL (verde). Ampliaciones en las zonas cercanas a 1.3, 2.3 y 6.7 ppm. Espectros normalizados a la señal residual de MeOD- d_4 .

5.4.2.2. Selección de disolventes de elución.

Como disolventes de elución se probaron metanol y diclorometano para determinar cuál de ellos eluye un mayor número de compuestos. Se comparó la elución con ambos disolventes puros y de manera fraccionada en diferente orden de elución (Tabla 12); la evaporación de los extractos se realizó con flujo de nitrógeno, utilizando como disolvente de reconstitución MeOD- d_4 .

Tabla 12 Disolventes de elución para EFS.

Extracción	Eluyente	Volumen de elución	Clave
A	DCM	5 mL	A-DCM
B	MeOH	5 mL	B-MeOH
C	DCM	3 mL	C-DCM
	MeOH	3 mL	C-MeOH
D	MeOH	3 mL	D-MEOH
	DCM	3 mL	D-DCM

*DCM: diclorometano, MeOH: metanol

En la Figura 21 se muestran los resultados de las extracciones con DCM y MeOH. En los espectros se observa que se eluyen una mayor cantidad de metabolitos con metanol a lo largo de todo el espectro, especialmente en la región aromática (6-7.5 ppm).

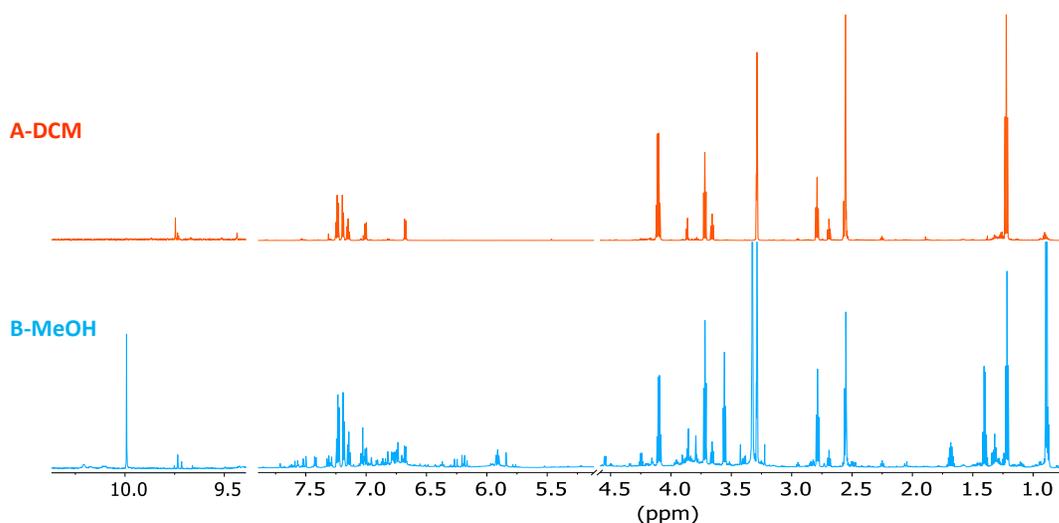


Figura 21 Espectros apilados ^1H -RMN (700 MHz, MeOD-d_4 , 25°C) de muestras de vino preparadas con EFS y eluidas con: Diclorometano (Anaranjado) y Metanol (Azul). En la región de 9.5-10 ppm se aumentó la intensidad 5 veces con respecto a la señal residual del MeOD-d_4 a la cual se normalizó el espectro.

En la Figura 22 se presentan los espectros apilados de las eluciones fraccionadas; en la extracción C donde se eluyó primero con DCM y posteriormente con MeOH se observa que el DCM eluye un conjunto de compuestos y posteriormente el MeOH otros, pero se observa la pérdida de algunos metabolitos como el alcohol isoamílico (0.9, 1.6 y 3.6 ppm). Por otro lado, en la extracción D eluida con metanol y

posteriormente con DCM, se observa que prácticamente todos los metabolitos se eluyen con el MeOH mientras que en la fracción D-DCM hay una mínima cantidad de metabolitos. Por lo tanto, se decidió utilizar metanol como único disolvente de elución ya que permite obtener un extracto más enriquecido sin pérdida de metabolitos.

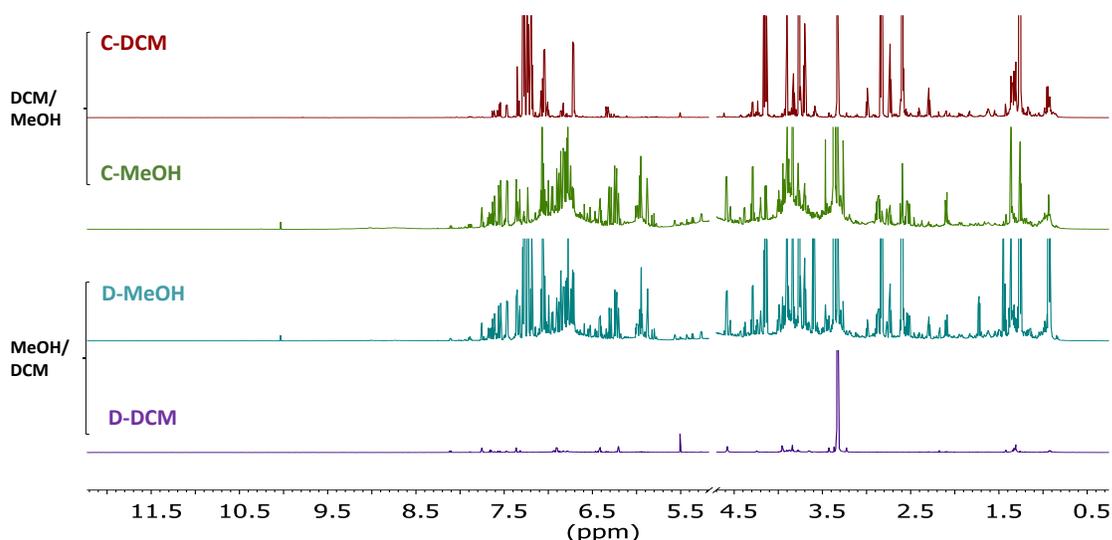


Figura 22. Espectros apilados ^1H -RMN (700 MHz, MeOD-d_4 , 25°C) de los extractos obtenidos por EFS realizados con eluciones fraccionadas. De arriba abajo: elución con DCM (C-DCM) y posteriormente con metanol (C-MeOH), extracción con Metanol (D-MeOH) y posteriormente con DCM (D-DCM). Espectros normalizados a la señal residual del MeOD-d_4 .

5.4.2.1. Selección de disolventes de reconstitución.

Como disolventes de reconstitución del extracto se probaron MeOD-d_4 y CDCl_3 . En la Figura 23 se observa que se tienen las mismas señales con ambos disolventes pero con desplazamientos químicos ligeramente diferentes y con MeOD-d_4 se observa una mayor dispersión de las señales en algunas regiones del espectro como en la región de 7.2-7.3 ppm (Ampliación en Figura 23). También se evaluó la estabilidad la muestra adquiriendo los espectros cinco días después de su preparación, los resultados indican que el extracto reconstituido en CDCl_3 (el cual es muy volátil) no es estable, pues hay un cambio de coloración y formación de un precipitado (Figura 24). Por ello, al tener una mejor dispersión de señales y estabilidad del extracto se eligió MeOD-d_4 como disolvente de reconstitución.

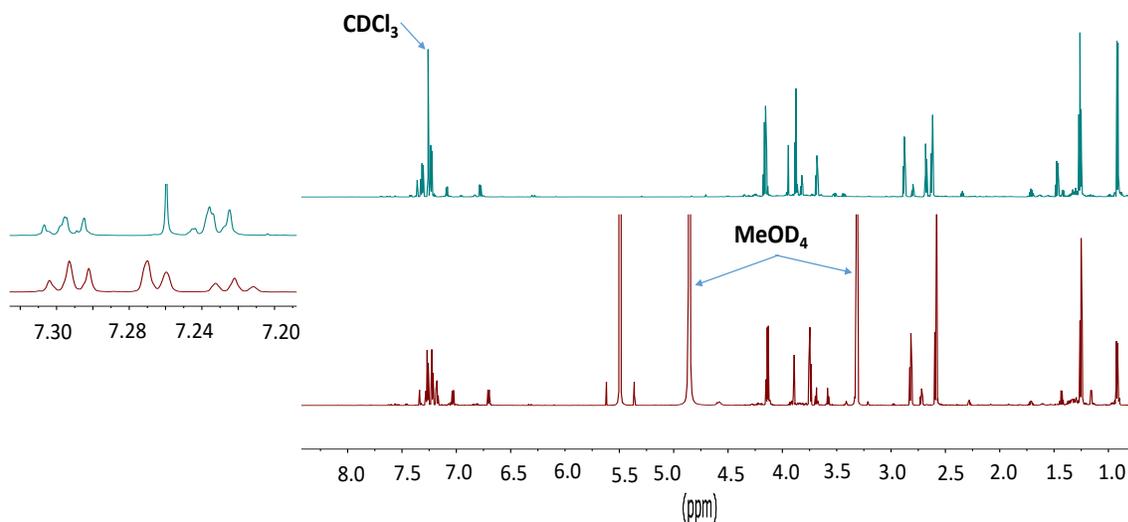


Figura 23. Espectros apilados ^1H -RMN (700 MHz, 25°C,) de una muestra vino preparada con EFS y reconstituida con CDCl_3 (azul) y MeOD-d_4 (marrón), con ampliación de la región de 7.2-7.3 ppm. Los espectros se normalizaron a la señal de succinato de dietilo (1.5 ppm)

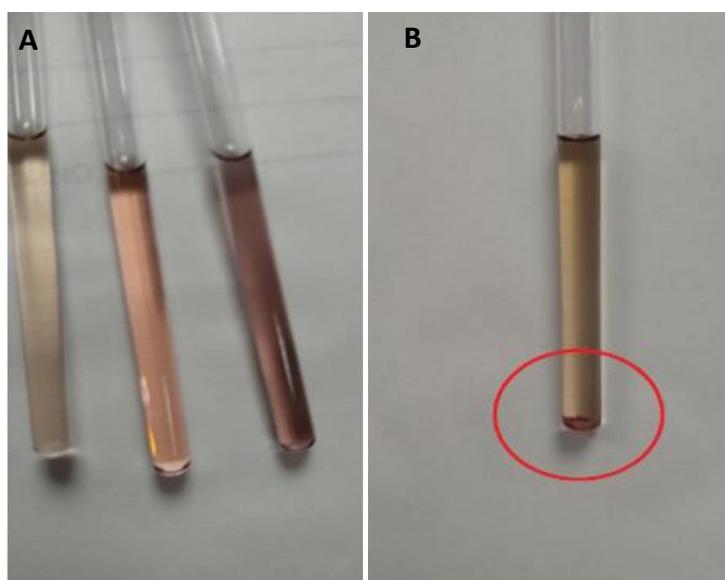


Figura 24. **A** Fotografía de los extractos a los 3, 4 y 5 días después de la reconstitución con CDCl_3 , en donde se observa el oscurecimiento de la muestra con el paso del tiempo. **B** Fotografía del precipitado observado en el extracto reconstituido con CDCl_3 después de 5 días.

5.4.3. Repetibilidad de la extracción en fase sólida

Una vez que se establecieron como condiciones óptimas 200 mg de adsorbente, 40 mL de muestra, metanol como disolvente de elución y MeOD-d_4 como disolvente de reconstitución; se evaluó la repetibilidad del método realizando un triplicado de

extracciones de una muestra de Cabernet Sauvignon. En los espectros superpuestos se puede apreciar que no hay diferencia visual entre ellos (Figura 25).

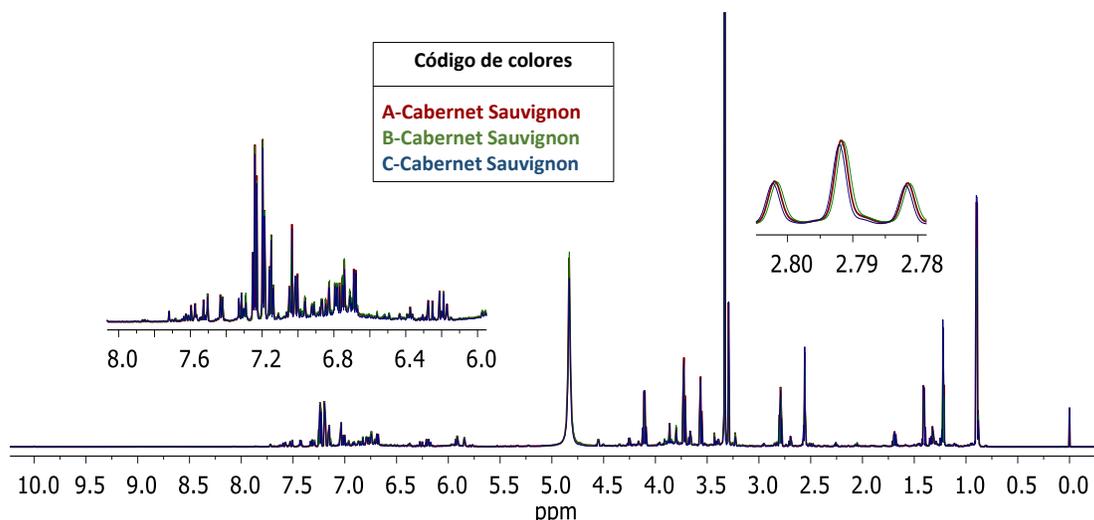


Figura 25. Espectros superpuestos ^1H -RMN (700 MHz, MeOD-d_4 , 25 °C) de una muestra de vino variedad Cabernet Sauvignon realizada por triplicado para evaluar la repetibilidad del método de EFS. Espectros normalizados a la señal del TSP.

Para comprobar que no existe diferencia significativa entre las muestras, se procedió a la reducción dimensional del espectro realizando primero un *binning* utilizando el programa Chenomx (versión 8.3) con un tamaño de 0.004 ppm para dar 2450 bins; posteriormente, se realizó un gráfico control al 95 % de confianza del primer componente PC1 de un análisis multivariante PCA (Figura 26) con el programa SIMCA (versión 16.0.1).

El PC1 explica el 94 % de la variabilidad de los datos (Figura 27) por lo que se tiene una gran cantidad de información del sistema; al tener una R^2 de 0.94 y una Q^2 de 0.84 que explican la varianza y la buena predictibilidad del modelo, respectivamente. Además, como se observa en la gráfica control, la variabilidad entre muestras puede ser explicada por el error aleatorio, ya que no hay diferencia significativa entre ellas al estar dentro del intervalo de confianza del valor medio; por consiguiente, el método es repetible.

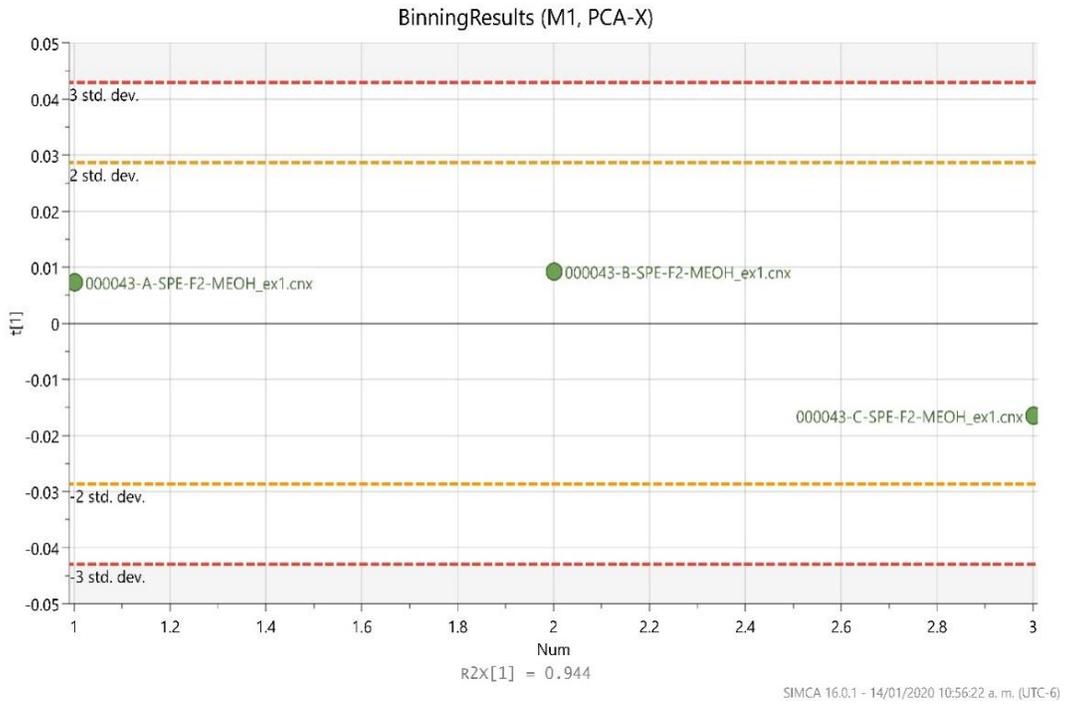


Figura 26. Gráfico control del primer componente PC1 que explica el 94% de la variabilidad de los datos.

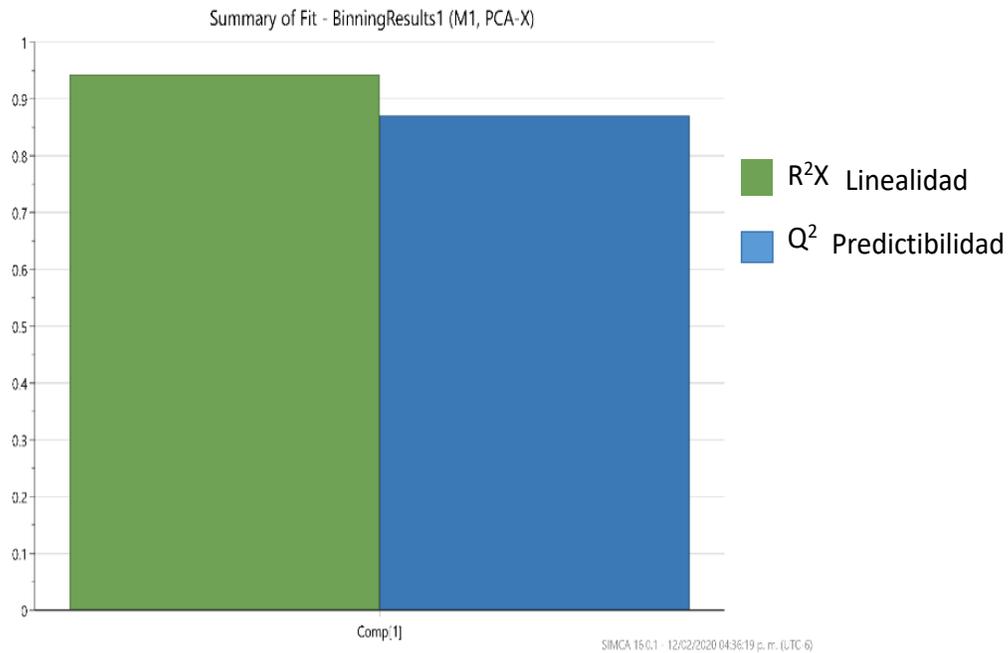


Figura 27. Gráfico de acantilado mostrando la varianza explicada del modelo de PCA con un componente principa..

5.4.4. Análisis de muestras con EFS

Se realizó la identificación de los metabolitos presentes mediante el análisis de los desplazamientos químicos de las señales y sus constantes de acoplamiento, además se realizaron experimentos bidimensionales para confirmar conectividades. Los metabolitos identificados se encuentran marcados en el espectro con código numérico (Figura 28 y Figura 29). Los desplazamientos químicos y la multiplicidad se describen en la Tabla 13.

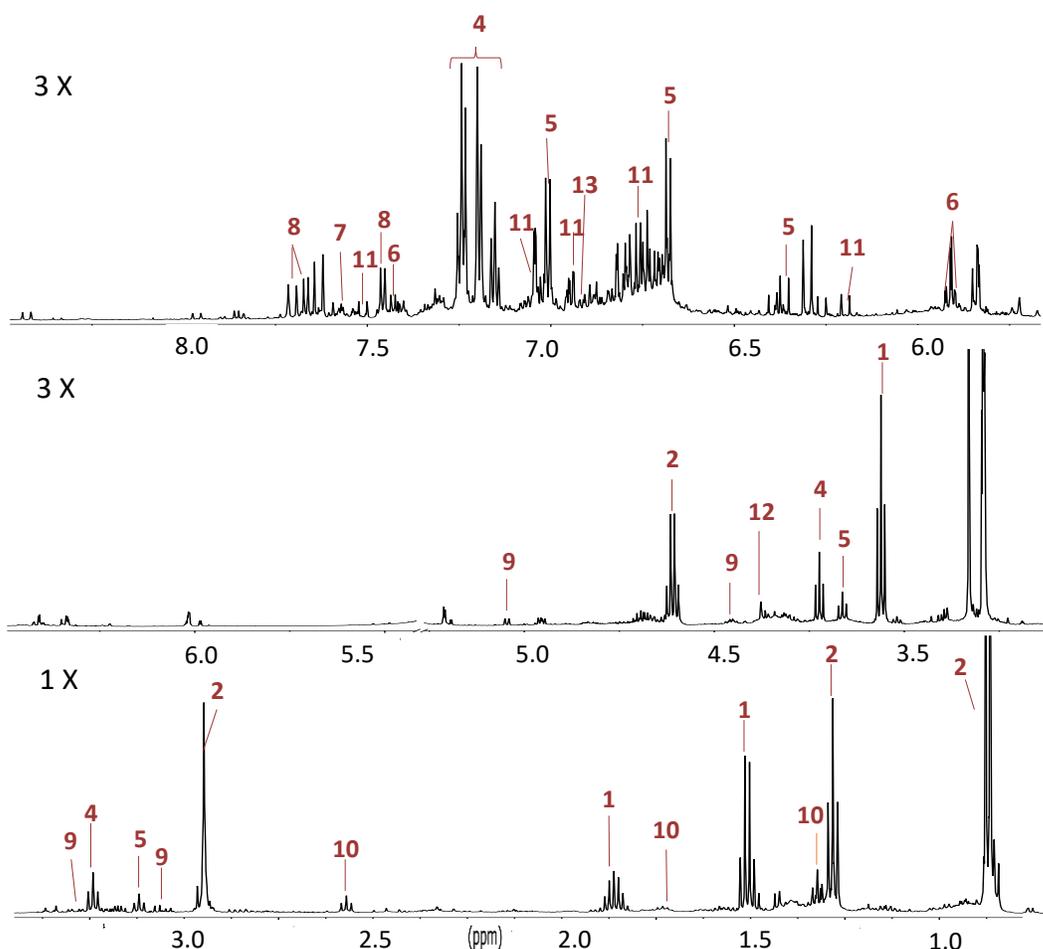


Figura 28. Espectro ^1H -RMN (700 MHz, MeOD-d_4 , 25 $^\circ\text{C}$) con la identificación de los metabolitos presentes en una muestra de vino blanco por EFS. Los siguientes metabolitos se identifican con un número: 1 alcohol isoamílico, 2 succinato de dietilo, 3 etil hidrogen succinato 4 alcohol fenetílico, 5 tirosol, 6 epicatequina, 7 ácido caftárico, 8 ácido trans-p-coutarico, 9 catequina, 10 ácido butírico 11 ácido cafeico, 12 ácido siríngico, 13 ácido vainíllinico.

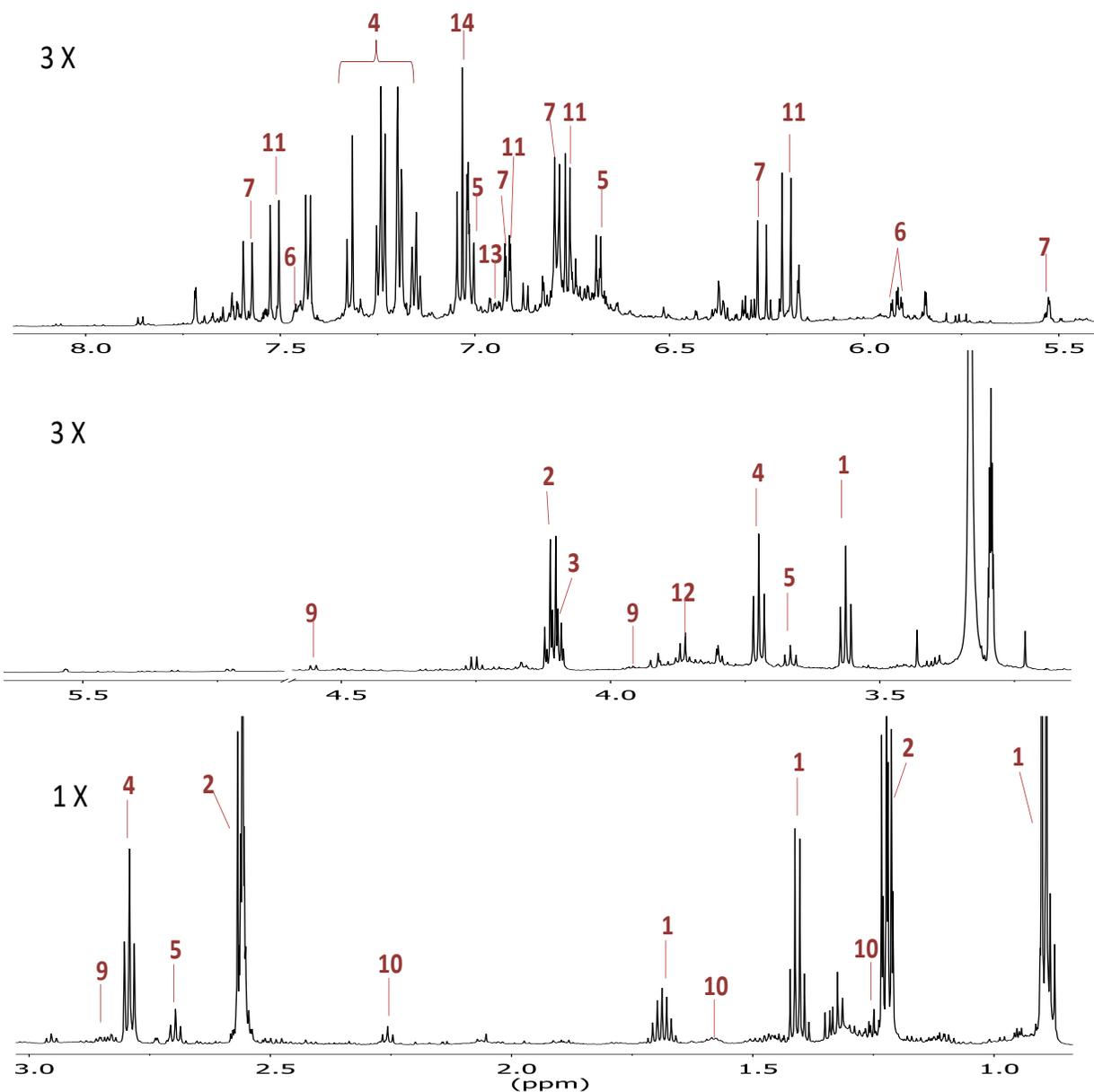


Figura 29. Espectro ^1H -RMN (700 MHz, MeOD-d_4 , 25 $^\circ\text{C}$) con la identificación de los metabolitos presentes en una muestra de vino tinto por EFS. Los siguientes metabolitos se identifican con un numero: 1 alcohol isoamílico, 2 succinato de dietilo, 3 etil hidrogen succinato 4 alcohol fenético, 5 tirosol, 6 epicatequina, 7 ácido cáftarico, 8 ácido *trans-p*-couterano, 9 catequina, 10 ácido butírico 11 ácido cafeico, 12 ácido sirínigico, 13 ácido vainíllinico, 14 ácido gálico.

Tabla 13 Compuestos indentificados en muestra de EFS.

Número	Nombre	δ (Multiplicidad, constante de acoplamiento, asignación)
1	Alcohol isoamilíco	0.90 (d, $J = 6.7$ Hz, CH ₃), 1.41 (q, $J = 6.9$, CH ₂), 1.68 (m, CH), 3.56 (t, $J = 6.9$ Hz, CH ₂)
2	Succinato de dietilo	1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, CH ₃), 2.57 (s, CH ₂), 4.10 (q, $J = 7.1$ Hz, CH ₂)
3	Etil hidrogen succinato	1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, CH ₃), 2.56 (m, CH ₂), 4.11 (q, $J = 7.1$ Hz, CH ₂)
4	Alcohol fenetílico	2.79 (t, $J = 7.1$ Hz, CH ₂), 3.72 (t, $J = 7.1$ Hz, CH ₂), 7.15 (m, CH), 7.20 (m, CH) 7.24 (m, CH)
5	Tirosol	2.70 (t, $J = 7.2$ Hz, CH ₂), 3.66 (t, $J = 7.2$ Hz, CH ₂), 6.68 (d, $J = 8.5$ Hz, CH), 7.01 (d, $J = 8.5$, CH)
6	Epicatequina	5.92 (d, $J = 2.3$ Hz, CH), 5.90 (d, $J = 2.3$ Hz, CH), 7.43 (d, $J = 8.6$ Hz, CH)
7	Ácido Caftárico	5.53 (m, CH), 6.26 (d, $J = 16.0$ Hz, CH), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, CH), 6.95 (d, 2.1 Hz, CH), 7.63 (d, $J = 16.0$ Hz, CH)
8	Ácido trans-p-coutarico	7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, CH), 7.67 (d, $J = 8.7$, CH), 7.70 (d, $J = 15.8$, CH)
9	Catequina	2.65 (dd, $J = 16.1, 7.3$ Hz, CH), 2.83 (dd, $J = 16.1, 5.4$ Hz, CH), 3.96 (td, $J = 7.9, 5.4$ Hz, CH), 4.55 (d, $J = 7.5$ Hz, CH)
10	Ácido butírico	1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, CH ₃), 1.59 (m CH ₂), 2.26 (t, $J = 7.4$ Hz CH ₂);
11	Ácido cafeíco	6.20 (d, $J = 16.0$ Hz, CH), 6.76 (d, $J = 8.2$ Hz, CH), 6.94 (d, 2.1 Hz, CH), 7.5 (d, $J = 16.0$ Hz, CH)
12	Ácido siríngico	3.88 (s, CH)
13	Ácido vainillínico	6.92 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, CH)
14	Ácido gálico	7.03 (s, CH)

En la Figura 30 se muestran 8 espectros apilados de los vinos blancos y tintos de diferente variedad de uva, preparados con el método de EFS. La principal diferencia que se puede observar es que la intensidad relativa de las señales de la zona aromática (6.0-7.5 ppm) es mayor en vinos tintos que en blancos, especialmente el alcohol feniletílico (7.19-7.24 ppm). Adicionalmente las señales del succinato de dietilo (4.10, 2.26 y 1.22 ppm) tienen una intensidad relativa menor en los vinos blancos, lo cual es más notorio en la muestra *Blanc de Blancs*.

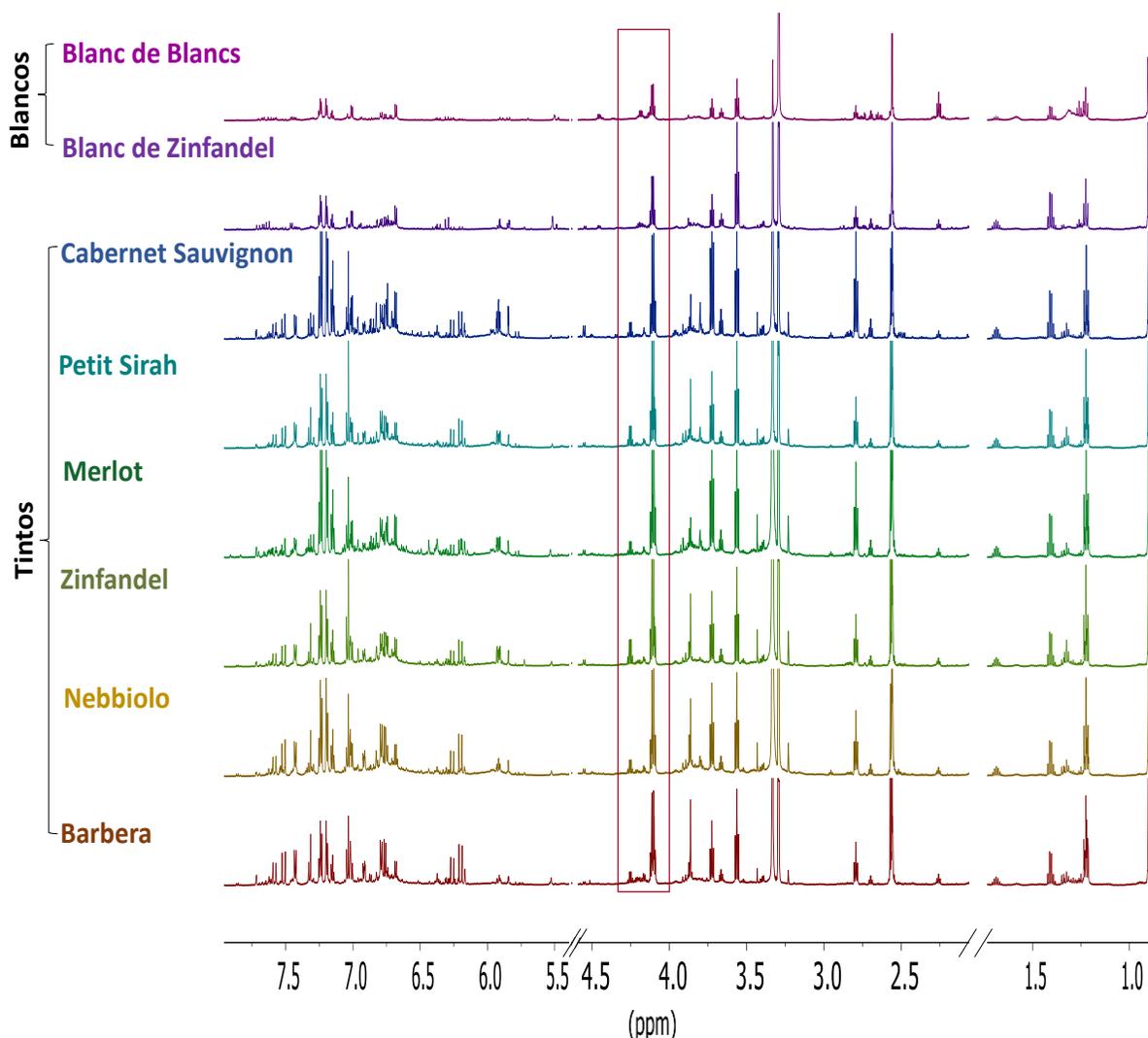


Figura 30. Espectros apilados ^1H -RMN (700 MHz, MeOD-d_4 , 25°C ,) de las muestras de vino preparadas con EFS. Todos los espectros se normalizaron al TSP. En las regiones de 1-1.5 ppm y 5.5-8.0 ppm se aumentó dos y tres veces la intensidad. La señal dentro del recuadro corresponde al succinato de dietilo.

5.4.5. Comparación de EFS y análisis directo.

Al comparar los perfiles espectrales obtenidos con análisis directo y EFS se observó que hay cinco metabolitos en común en ambos métodos: alcohol isoamílico, alcohol fenílico, ácido cafeico, epicatequina y ácido gálico. Los alcoholes isoamílico y fenílico son de los alcoholes mayoritarios del vino por lo que sus señales se observan bien tanto en EFS como en análisis directo, en cuanto al ácido cafeico se encuentra casi a nivel de ruido en el primero y se concentra en el segundo; la epicatequina está a nivel de ruido en ambos.

6. Conclusión

Se obtuvo el perfil espectroscópico de ^1H RMN de muestras de vino con diferentes procedimientos de preparación de muestra; teniendo como resultado que el análisis directo nos da un perfil general de los compuestos mayoritarios del vino mientras que la EFS concentra los compuestos aromáticos y alcoholes superiores.

- Con el método de análisis directo la manipulación de la muestra es mínima y se obtuvo un perfil espectral en donde se lograron identificar 28 metabolitos.
- Con los métodos de pre-concentración liofilización y evaporación con N_2 , en las condiciones experimentales probadas, se encontraron varias desventajas, como el que no se elimina en su totalidad el agua y el etanol, sumado a una pérdida, total o parcial de los metabolitos más volátiles o poco solubles en agua.
- Con el método de EFS se elimina por completo el agua y el etanol; y se obtuvo un perfil espectral en donde se lograron identificar 14 metabolitos, de los cuales cinco se identificaron también por análisis directo.
- El análisis de los perfiles espectrales obtenidos con ambos métodos permite observar las principales diferencias entre vinos tintos y blancos. Con el método de análisis directo dichas diferencias recaen en las regiones aromáticas (6-8 ppm) y de carbohidratos (3-5 ppm), pues los vinos tintos tienen una mayor intensidad de señales en la primera mientras que en los blancos en la segunda. Por otra parte, con el método de EFS la diferencia de la región aromática es aún más evidente.

7. Bibliografía

- 1 Aru, V.; Sørensen, K.; Khakimov, B.; Toldam-Andersen, T.; Balling Engelsen, S., Cool-Climate Red Wines—Chemical Composition and Comparison of Two Protocols for ^1H -NMR Analysis. *Molecules* **2018**, 23 (1), 160.
- 2 Margalit, Y. Concepts in wine chemistry. *Board and Bench Publishing*. **2012**.pp 62-70
- 3 Rituerto, E. L. La Resonancia Magnética Nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de Vinificación. Tesis doctoral, Universidad de La Rioja, **2012**.
- 4 Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. Wine chemistry and biochemistry. *New York: Springer*. **2009**, 735, 7-24.
- 5 Prakash, S.; Iturmendi, N.; Grelard, A.; Moine, V.; Dufourc, E., Quantitative analysis of Bordeaux red wine precipitates by solid-state NMR: Role of tartrates and polyphenols. *Food chemistry* **2016**, 199, 229-237.
- 6 Byarugaba-Bazirake, G. W. The effect of enzymatic processing on banana juice and wine. Tesis doctoral, Universidad de Stellenbosch, diciembre **2008**.
- 7 Dunn, W. B.; Ellis, D. I., Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2005**, 24 (4), 285-294.
- 8 García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A., Present and future challenges in food analysis: foodomics. *Analitical Chemistry Publications*: **2012**, 84, 23, 10150-10159.
- 9 Hong, Y. S., NMR-based metabolomics in wine science. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2011**, 49, S13-S21.
- 10 Gowda, G. N.; Raftery, D., Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *Journal of Magnetic Resonance* **2015**, 260, 144-160.
- 11 Reo, N. V., NMR-based metabolomics. *Drug and chemical toxicology* **2002**, 25 (4), 375-382.
- 12 Wishart, D. S., Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC trends in analytical chemistry* **2008**, 27 (3), 228-237.
- 13 Alam, T. M., & Alam, M. K. Chemometric analysis of NMR spectroscopy. *Ann R NMR S*, **2005**, 54, 41-79.
- 14 Tortosa Muñoz, G. Caítulo 1 Introducción. *Manual práctico de Quimiometría*; Editorial: Digital.CSIC, **2011**.
- 15 Trygg, J.; Gullberg, J.; Johansson, A.; Jonsson, P.; Moritz, T., Chemometrics in metabolomics—an introduction. *In Plant metabolomics, Springer*: **2006**; pp 117-128.
- 16 Cordella, C. B. PCA: the basic building block of chemometrics. *Analytical chemistry*, **2012**, V5 pp 154.

-
- 17 Alonso, I. S., Ruiz, S. G., Quintanilla, D. P., & Zarcero, S. M. *Análisis instrumental* (Vol. 1). Netbiblo. **2009**, 102-105.
- 18 Schnell,. Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. Fourth, Completely Revised and Updated Edition. By Horst Friebolin. *ChemPhysChem* **2005**, 6(6), 1187-1188.
- 19 German Fernández. Capítulo 4 Resonancia Magnética Nuclear de protón. *Determinacion Estructural de Compuestos Organicos*. Ernö Pretsch; El sevier: España, **2002**, pp 77-75.
- 20 Wishart, D. S., & Sykes, B. D. Chemical shifts as a tool for structure determination. In *Methods in enzymology* **1994** (Vol. 239, pp. 363-392). Academic Press.
- 21 Rico, M. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución: una herramienta fundamental en Química y Biología Estructural. *In Anales de Química* **2011** (Vol. 107, No. 1).
- 22 Laurella, S. L. Resonancia magnética nuclear; Universidad de Plata: Argentina, **2017** pp 33-40.
- 23 Arvanitoyannis, I. S., Katsota, M. N., Psarra, E. P., Soufleros, E. H., & Kallithraka, S. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science & Technology*, **1999** 10(10), 321-336.
- 24 Son, H.-S.; Kim, K. M.; Van Den Berg, F.; Hwang, G.-S.; Park, W.-M.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S., ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, 56 (17), 8007-8016.
- 25 Viggiani, L.; Morelli, M. A. C., Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: a work study on wines from the Basilicata region in Italy. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, 56 (18), 8273-8279.
- 26 Mazzei, P.; Francesca, N.; Moschetti, G.; Piccolo, A., NMR spectroscopy evaluation of direct relationship between soils and molecular composition of red wines from Aglianico grapes. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 673 (2), 167-172.
- 27 López-Rituerto, E., Savorani, F., Avenoza, A., Busto, J. H., Peregrina, J. M., & Engelsen, S. B. Investigations of La Rioja terroir for wine production using ¹H NMR metabolomics. *Journal of agricultural and food chemistry* **2012.**, 60(13), 3452-3461.
- 28 Godelmann, R.; Fang, F.; Humpfer, E.; Schütz, B.; Bansbach, M.; Schäfer, H.; Spraul, M., Targeted and nontargeted wine analysis by ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. Differentiation of important parameters: grape variety, geographical origin, year of vintage. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, 61 (23), 5610-5619.
- 29 Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. Effects of area, year and climatic factors on Barbera wine characteristics studied by the combination of ¹H-NMR metabolomics and chemometrics. *Journal of wine research* **2017**, 28(4), 259-277.

-
- 30 Giraudo, M., Vicente, F., Tuero, H. S., Pavesi, R., Markowski, I., & Guirin, G.. Estudio de vinificación en Argentina a partir de los aminoácidos libres en la producción de vino tinto (Merlot) y blanco (Torrontés) utilizando diferentes levaduras (nativa y cultivadas). *Enólogos* **2006**, (44), 24-29.
- 31 Son, H.-S.; Kim, K. M.; Van Den Berg, F.; Hwang, G.-S.; Park, W.-M.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S., ^1H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, 56 (17), 8007-8016.
- 32 Son, H.-S.; Hwang, G.-S.; Ahn, H.-J.; Park, W.-M.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S., Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ^1H NMR spectroscopic data. *Food Research International* **2009**, 42 (10), 1483-1491.
- 33 Rochfort, S.; Ezernieks, V.; Bastian, S. E.; Downey, M. O., Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food chemistry* **2010**, 121 (4), 1296-1304.
- 34 Monakhova, Y. B.; Godelmann, R.; Kuballa, T.; Mushtakova, S. P.; Rutledge, D. N., Independent components analysis to increase efficiency of discriminant analysis methods (FDA and LDA): Application to NMR fingerprinting of wine. *Talanta* **2015**, 141, 60-65.
- 35 Hu, B.; Yue, Y.; Zhu, Y.; Wen, W.; Zhang, F.; Hardie, J. W., Proton nuclear magnetic resonance-spectroscopic discrimination of wines reflects genetic homology of several different grape (*V. vinifera* L.) cultivars. *PloS one* **2015**, 10 (12), e0142840.
- 36 Ragone, R., Crupi, P., Piccinonna, S., Bergamini, C., Mazzone, F., Fanizzi, F. P., ... & Antonacci, D. Classification and chemometric study of Southern Italy monovarietal wines based on NMR and HPLC-DAD-MS. *Food Science and Biotechnology* **2015**, 24(3), 817-826.
- 37 Geana, E. I.; Popescu, R.; Costinel, D.; Dinca, O. R.; Ionete, R. E.; Stefanescu, I.; Artem, V.; Bala, C., Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistical analysis. *Food chemistry* **2016**, 192, 1015-1024.
- 38 Giraudo, M., Vicente, F., Tuero, H. S., Pavesi, R., Markowski, I., & Guirin, G.. Estudio de vinificación en Argentina a partir de los aminoácidos libres en la producción de vino tinto (Merlot) y blanco (Torrontés) utilizando diferentes levaduras (nativa y cultivadas). *Enólogos* **2006**, (44), 24-29.
- 39 Fan, S.; Zhong, Q.; Fauhl-Hassek, C.; Pfister, M. K.-H.; Horn, B.; Huang, Z., Classification of Chinese wine varieties using ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food control* **2018**, 88, 113-122.
- 40 Consonni, R., Cagliani, L. R., Guantieri, V., & Simonato, B. Identification of metabolic content of selected Amarone wine. *Food chemistry* **2011**, 129(2), 693-699.

-
- 41 Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. Wine evolution during bottle aging, studied by ^1H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research International* **2019**, 116, 566-577.
- 42 López-Rituerto, E., Cabredo, S., Lopez, M., Avenoza, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. A thorough study on the use of quantitative ^1H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, 57(6), 2112-2118.
- 43 Lee, J.-E.; Hwang, G.-S.; Lee, C.-H.; Hong, Y.-S., Metabolomics reveals alterations in both primary and secondary metabolites by wine bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, 57 (22), 10772-10783.
- 44 Son, H. S., Hwang, G. S., Park, W. M., Hong, Y. S., & Lee, C. H. Metabolomic characterization of malolactic fermentation and fermentative behaviors of wine yeasts in grape wine. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, 57(11), 4801-4809.
- 45 Godelmann, R., Kost, C., Patz, C. D., Ristow, R., & Wachter, H. Quantitation of compounds in wine using ^1H NMR spectroscopy: description of the method and collaborative study. *Journal of AOAC International* **2016**, 99(5), 1295-1304.
- 46 Gougeon, L., da Costa, G., Richard, T., & Guyon, F. Wine Authenticity by Quantitative ^1H NMR Versus Multitechnique Analysis: a Case Study. *Food Analytical Methods* **2019**, 12(4), 956-965.
- 47 Amaral, F. M., & Caro, M. S. Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of Brazilian white wine. *Food chemistry* **2005**, 93(3), 507-510.
- 48 Aru, V., Sørensen, K., Khakimov, B., Toldam-Andersen, T., & Balling Engelsen, S. Cool-Climate Red Wines—Chemical Composition and Comparison of Two Protocols for ^1H -NMR Analysis. *Molecules*, **2018**, 23(1), 160.
- 49 <https://www.theresonance.com/ph-titration/> de Bruker, consultada en febrero 2020.
- 50 Rajković, M. B., Novaković, I. D., & Petrović, A. Determination of titratable acidity in white wine. *Journal of Agricultural Sciences*, **2007**, 52(2), 169-184.
- 51 Imparato, G., Paolo, E. D., Braca, A., & Lamanna, R. Nuclear magnetic resonance profiling of wine blends. *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, 59(9), 4429-4434.
- 52 Jennings, T. A. Lyophilization: introduction and basic principles. **1999**, CRC press.101-112.
- 53 Ramírez-Navas, J. S. Liofilización de alimentos. **2006**, *Revista ReCiTeIA*. 8-14.
- 54 <http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/RVAPS.PDF> consultado en febrero 2020.
- 55 Dean, J. R. *Extraction techniques in analytical sciences* (Vol. 34). John Wiley & Sons. **2010** pp 49-63.
- 56 Warner, I. M. (2000). *Analytical Solid-Phase Extraction* By James S. Fritz (Iowa State University). John Wiley & Sons (Wiley-VCH): New York. **1999**. Pp 28-39,54.

-
- 57 Sánchez-Palomo, E.; Alonso-Villegas, R.; Viñas, M. G., Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of La Mancha Verdejo white wines. *Food chemistry*, **2015**, 173,1195-1202.
- 58 Bruker. Automatic SPE Extraction of Red Wine for NMR: A New Tool for Chemometrics and Hyphenation. https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/MagneticResonance/NMR/Food/T160398_SPE-NMR-WIne-App-Note.pdf. Consultada en febrero 2020.
- 59 Ale, C. E., Otero, M. C., & Pasteris, S. E. Freeze-drying of wine yeasts and *Oenococcus oeni* and selection of the inoculation conditions after storage. **2015**.
- 60 Monakhova, Y. B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Kuballa, T., & Lachenmeier, D. W. Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2011**, 49(11), 734-739.