



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO METABOLOMICO POR RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE  
MUESTRAS DE VINO EN FUNCIÓN DE LAS CONDICIONES DE  
ALMACENAMIENTO PARA SU TRANSPORTE UNA VEZ ABIERTA LA BOTELLA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Químico

PRESENTA

MARIANA MISHIEL GARCIA GARNICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AÑO 2021





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 Alvarez

VOCAL: Francisco Ruiz Teran

SECRETARIO: Nuria Esturau Escofet

1er SUPLENTE: Juan Rolando Vazquez Miranda

2do SUPLENTE: Iran Ocaña Rios

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:



Laboratorio Universitario de Resonancia magnética Nuclear y Laboratorio 2-4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA

---

Dra. Nuria Esturau Escofet

SUPERVISOR TÉCNICO

---

Dra. Irán Ocaña Ríos

SUSTENTANTE

---

Mariana Mishel Garcia Garnica

## Agradecimientos

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

A la beca otorgada por el Proyecto SAGARPA CONACYT 2017-06-292836 “Plataforma nacional de metabolómica basada en espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) OMICS para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario”.

Al instituto de química de la UNAM por brindarme los medios necesarios para el desarrollo del presente trabajo.

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

A la Dra. Nuria Esturau, por el tiempo, las enseñanzas y la confianza.

A mis compañeros de laboratorio que me acompañaron en el camino.

## Índice

1	Introducción .....	7
2	Hipótesis .....	8
3	Objetivos.....	8
3.1	Objetivo general .....	8
3.2	Objetivos específicos .....	8
4	Antecedentes.....	9
4.1	El vino .....	9
4.1.1	Composición química del vino. ....	9
4.2	Factores que afectan la composición después de ser embotellado. ....	10
4.2.1	Influencia del oxígeno.....	11
4.2.2	El efecto de la temperatura.....	12
4.3	Métodos instrumentales de análisis para el estudio del vino.....	13
4.4	Metabolómica.....	13
4.4.1	Metabolómica basada en RMN para el análisis del vino. ....	14
4.5	Resonancia Magnética Nuclear .....	15
4.5.1	Conceptos básicos .....	15
4.6	Espectro de RMN.....	17
4.7	Quimiometría.....	18
5	Metodología.....	19
5.1	Muestras de vino.....	19
5.2	Condiciones de almacenamiento .....	19
5.2.1	Nivel de llenado .....	19
5.2.2	Condiciones de almacenamiento.....	20
5.2.3	Tiempo de almacenamiento .....	20

5.3	Análisis por RMN.....	21
5.3.1	Preparación de la disolución del estándar de referencia .....	21
5.3.2	Preparación de las muestras .....	21
5.3.3	Adquisición de espectros de RMN.....	21
5.3.4	Procesamiento de espectros .....	22
5.3.5	Identificación de metabolitos .....	22
5.4	Análisis quimiométrico.....	23
6	Resultados y discusión .....	24
6.1	Espectro de RMN e identificación de metabolitos .....	24
6.2	Cambios observados en las muestras preparadas en un lapso no mayor a 12 h.	26
6.3	Estudio de los cambios en el metaboloma en función del tiempo y temperatura.....	27
6.4	Estudio de cambios en el metaboloma en relación de la cantidad de aire.	36
6.5	Cambios físicos durante almacenamiento.....	38
6.6	Análisis quimiométrico.....	39
7	Conclusiones .....	42
8	Referencias.....	43

## Abreviaturas

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética nuclear de protón
PCA	Análisis de Componentes Principales ( <i>Principal Component Analysis</i> )
PLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ( <i>Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i> )
OPLS-DA	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales ( <i>Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant analysis</i> )
CP	Componente Principal
TA	Tubos con tapa abovedada
TP	Tubos con tapa plana
TAA	Tubos con tapa abovedada llenos al 50% de su capacidad
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
ppm	Partes por millón
% p/p	Porcentaje peso/peso
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
NLL	Nivel de llenado
TSP	Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico
FID	Decaimiento por inducción libre

## 1 Introducción

El vino es una bebida alcohólica obtenida de la fermentación del mosto o jugo de uva (especie *Vitis vinífera*). La fermentación se produce por la acción metabólica de levaduras, que transforman los azúcares naturales de la uva en etanol y gas en forma de dióxido de carbono. Su composición es muy variada, además del etanol presenta muchos compuestos en menor cantidad, algunos provenientes de las uvas y otros que se añaden de forma artificial. El análisis del vino no es una tarea sencilla, ya que es una matriz muy compleja que incluye compuestos de diferente naturaleza.

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica muy robusta, versátil, rápida y no destructiva, que desde hace muchos años se usa para la determinación estructural de las moléculas orgánicas. Sin embargo, en los últimos años, gracias a los avances instrumentales, su aplicación al análisis de mezclas 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, tanto a nivel académico como industrial e incluso regulatorio, con diversos enfoques, como son: el análisis de los componentes, la evaluación de la calidad, la determinación de origen o detección de adulteraciones, etc. En el campo concreto del vino, la técnica permite investigar la calidad y la autenticidad, así como monitorear este producto desde el viñedo hasta la bodega.

Este trabajo, es parte del proyecto SAGARPA-CONACYT No. 292836 “Plataforma nacional de metabolómica basada en espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario”, que tiene como objetivo crear una base de datos de “Huellas dactilares de RMN de protón” para vinos de México y requiere la obtención de un protocolo para el traslado de muestras en los casos que no se pueda trasladar una botella sin descorchar. En la presente tesis se estudiarán los cambios en el espectro de RMN de muestras de vino analizadas al momento de abrir una botella y días posteriores tras su almacenamiento en diferentes tipos de tubo y temperaturas.



## **2 Hipótesis**

El perfil metabólico de los vinos observado por  $^1\text{H}$ -RMN se verá modificado en función de las condiciones de almacenamiento.

## **3 Objetivos**

### **3.1 Objetivo general**

Conocer los cambios en el perfil espectral de  $^1\text{H}$ -RMN de las muestras de vinos tintos mexicanos en función del tiempo y temperatura de almacenamiento para determinar un intervalo en el cual estas condiciones permiten que las muestras continúen conservando sus perfiles espectrales característicos.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Identificar los cambios en las señales del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN producidos a diferentes tiempos y a 3 temperaturas de almacenamiento (4, 20 y 40 °C).
- Encontrar tendencias o agrupaciones de los datos espectrales de las muestras con modelos de análisis multivariado no supervisados (PCA).
- Evaluar si el nivel de llenado en el tubo de almacenaje es un factor que influye en el cambio del perfil espectral de las muestras durante el almacenamiento.

## 4 Antecedentes

### 4.1 El vino

De manera general el término “vino” es aplicado a cualquier producto resultante de la fermentación del jugo de uva.[1]

#### 4.1.1 Composición química del vino.

Desde el punto de vista químico el vino es una matriz muy compleja, con compuestos de diferente naturaleza química en distintas concentraciones. En la Tabla 1 se enlistan los grupos de compuestos y la concentración a la que se encuentran típicamente en el vino tinto, donde se puede ver que el agua y el etanol son los compuestos mayoritarios. El glicerol, ácidos orgánicos, azúcares y compuestos de origen inorgánico, que son los responsables del sabor y color, son compuestos minoritarios con concentraciones  $<10 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que las especies responsables del aroma están a nivel de trazas ( $\text{ng L}^{-1}$ ).[2]

**Tabla 1. Composición general de una muestra de vino tinto.[2]**

Compuesto	Concentración / % p/p	Roles mayoritarios en el vino
Agua	85-89	Táctil (sensación en la boca), componente mayoritario
Etanol	9-14	Táctil (pungencia, sensación en la boca), sabor (astringencia, amargo, dulce)
Glicerol	0.5-1.5	Ligera contribución al dulzor y cuerpo
Ácidos orgánicos	0.6-1.0	Sabor (ácido), amortiguador de pH
Azúcares	0.1-0.5	Sabor (dulce); efecto minoritario en la sensación de la boca
Polifenoles	0.1-0.2	Color, sensación en la boca (astringencia), antioxidantes
Minerales	0.05-0.2	Amortiguador de pH; menor efecto en el sabor
Odorantes	$<0.001$	Aroma

Después del agua y etanol, el glicerol es el compuesto químico de mayor concentración y es el subproducto más importante de la fermentación alcohólica. La concentración mínima del glicerol es de  $5 \text{ g L}^{-1}$ , pero puede alcanzar valores de hasta  $15\text{-}20 \text{ g L}^{-1}$ , dependiendo de las condiciones de fermentación (especialmente de los niveles de azufre del mosto).

Entre los componentes del vino se encuentran distintos tipos de ácidos que provienen de dos fuentes; unos derivados de la uva como el málico, tartárico y cítrico, y otros derivados de los distintos procesos de fermentación, como el succínico, acético y láctico; y contribuyen de manera importante a la composición, estabilidad y cualidades sensoriales de los vinos.[3][4] Los azúcares, principalmente glucosa y fructosa, son abundantes en la etapa previa a la fermentación alcohólica. Los compuestos fenólicos son un amplio grupo que engloba los ácidos fenólicos, los flavonoides, las antocianinas y los taninos, provienen de diferentes partes del racimo de uva y son extraídos durante la vinificación. Estas especies son responsables de las diferencias entre los vinos tintos y blancos, especialmente en el color y el sabor de los tintos.

Los minerales en el vino son todos los compuestos de naturaleza inorgánica, es decir, que no están constituidos por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. Los minerales surgen de varias fuentes, una de ellas es durante el procesamiento o aditivos utilizados durante la vinificación. El principal mineral disuelto en el vino proviene de sales de potasio (K) con contribuciones menores de sales de hierro (Fe), sodio (Na), cobre (Cu), calcio (Ca), magnesio (Mg), aluminio (Al), manganeso (Mn) y zinc (Zn), los ácidos orgánicos en las uvas son parcialmente neutralizados por los iones de K y Ca, formando sales. Esta formación de sales de los ácidos tartárico y málico proporciona al mosto y al vino una capacidad amortiguadora ácido-base. Los compuestos odorantes son componentes volátiles que pueden contribuir al aroma, y tales olores pueden clasificarse en función de cuando se forman, es decir, en la uva (primarios), durante la fermentación (secundarios) o durante el almacenamiento (terciarios).[5][6]

#### **4.2 Factores que afectan la composición después de ser embotellado.**

Una vez que se termina el proceso de vinificación y el vino es embotellado, los compuestos siguen teniendo interacciones que dan origen a reacciones químicas complejas, a través del tiempo y en función de las condiciones en las cuales permanezca almacenado, esto tiene consecuencias en su calidad de forma positiva o negativa.

Una vez que el vino es embotellado o envasado para ser almacenado o transportado, deben tenerse en cuenta diversos factores que influyen cambios en la composición química. La

oxidación de compuestos por la presencia de oxígeno molecular, la temperatura, el pH y el contenido fenólico afectan significativamente el potencial oxidativo del vino. Los iones de hierro y cobre presentes como contaminantes son los catalizadores oxidativos más conocidos, debido a que el potencial redox en el vino disminuye después del embotellado; la luz y la temperatura también son algunos de los factores que impactan el envejecimiento durante el almacenamiento.[7]

#### **4.2.1 Influencia del oxígeno.**

Para la producción de vino tinto, el oxígeno desempeña un papel importante al ser fundamental para distintos procesos enológicos, sin embargo, de no ser controlado se produce la oxidación de algunos compuestos, ya sea durante el proceso de vinificación o después del embotellamiento. Las especies reactivas de oxígeno, *ROS* (por sus siglas en inglés), es un término general que involucra especies radicales y no radicales de oxígeno. Los radicales de oxígeno son el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ), peróxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ) e hidroxiperoxilo ( $HOO^{\bullet}$ ). Los derivados no radicales son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ozono ( $O_3$ ) y el oxígeno en singulete ( $^1O_2$ ). Existen investigaciones sobre la química de los *ROS* y sus efectos en los alimentos, estas especies son los principales responsables del inicio de reacciones de oxidación en los alimentos pues interaccionan con lípidos, proteínas, azúcares y vitaminas para producir compuestos volátiles indeseables, degradar aminoácidos e incluso producir moléculas cancerígenas.[8], [9]

De manera general, la química de la oxidación del vino se inicia mediante la transferencia de electrones de un catalizador, como iones de hierro y cobre, al oxígeno para formar peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton involucra una catálisis ferrosa para producir el radical hidroxilo. Una vez producido este radical altamente inestable, reacciona casi de inmediato con todas las sustancias presentes en la solución, principalmente en proporción a su concentración.[10][11]

Halliwell (1995) definió un antioxidante como cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en relación con la del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato. Los antioxidantes solubles en agua más comunes en plantas y alimentos son los compuestos fenólicos. Estos metabolitos secundarios

de las plantas se caracterizan por un anillo aromático que posee uno o más sustituyentes hidroxilo. En los vinos tintos los compuestos fenólicos se encuentran en una concentración de 1 a 5 g L<sup>-1</sup>. Algunos de los efectos del oxígeno sobre los vinos tintos incluyen la disminución de los compuestos fenólicos como (+) – catequina, (-)- epicatequina, quercetina, ácido cafeico y antocianinas, así como un aumento en los pigmentos poliméricos rojos que bajo ciertas condiciones mejoran el color del vino. Debido a su estructura, los compuestos fenólicos tienen un papel de captadores de radicales libres por la estabilización de resonancia del electrón capturado. La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos está relacionada con la parte aromática de su estructura, especialmente con la posición de los grupos hidroxilo. La hidroxilación en las posiciones 2 y 4 ó 3, 4 y 5 (como en el caso del ácido gálico) le confiere una actividad antioxidante favorable. Para el caso de los flavonoides, las sustituciones tipo orto 3', 4''-dihidroxi en el anillo B, es una característica estructural que les confiere la deslocalización del electrón, estabilizando al radical, como en el caso de la catequina y epicatequina.[12] Uno de los compuestos con actividad antioxidante y antimicrobiana comúnmente usado es el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), que se usa desde el prensado hasta el embotellado, especialmente en vinos blancos, ya que puede inhibir la formación de aldehídos al competir con el peróxido de hidrógeno.[13]

#### **4.2.2 El efecto de la temperatura.**

La exposición del vino a temperaturas elevadas tiene un profundo impacto en reacciones de envejecimiento, calidad sensorial y vida útil.[14] Los vinos a menudo experimentan condiciones ambientales difíciles durante el transporte y el almacenamiento, lo que puede afectar directamente al color, el aroma y la sensación en la boca. Temperaturas altas o fluctuantes pueden acelerar el proceso de envejecimiento ya que, de acuerdo con la ecuación de Arrhenius, un aumento en la temperatura aumenta exponencialmente la velocidad de una reacción. Por lo tanto, a temperaturas más altas, se espera un aumento exponencial en las reacciones de oxidación. Existen estudios que investigan el impacto de la temperatura elevada en los vinos, como la reducción del dióxido de azufre, el desarrollo del color (especialmente en vinos blancos) y los cambios en el perfil de compuestos volátiles, sin embargo, estos estudios tienen un alcance limitado y tienden a enfocarse solo en un número restringido de tipos de vino o en compuestos específicos.[15]–[17]

### **4.3 Métodos instrumentales de análisis para el estudio del vino.**

El análisis de los componentes del vino es de gran importancia, ya que determinan de manera directa o indirecta su estabilidad y características organolépticas, además de que el conocimiento del perfil químico ayuda a prevenir malas prácticas que pueden incluso terminar en fraude. Las técnicas espectroscópicas ofrecen el potencial de simplificar y reducir los tiempos de análisis en los procesos de producción. Lo anterior, aunado a la capacidad de medir simultáneamente varios analitos, hacen que cada vez más métodos espectroscópicos sean empleados. Algunas de las técnicas analíticas que se utilizan para monitorear diferentes pasos de la producción del vino, son la espectroscopia ultravioleta-visible (UV-VIS), infrarrojo cercano (IR) e infrarrojo medio (IRM).[18]

Para el caso del producto terminado, las técnicas más utilizadas para su caracterización son: cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), espectrometría de masas (EM) y resonancia magnética nuclear (RMN). Las técnicas de CG y CLAR son técnicas de separación que generalmente se acoplan con EM y poseen una alta sensibilidad. La RMN a pesar de tener una menor sensibilidad (en comparación a las técnicas antes mencionadas), es una técnica no destructiva, selectiva y capaz de detectar simultáneamente una gran cantidad de componentes, además de que la preparación de la muestra es simple, requiere de menos tiempo de análisis y es altamente reproducible.[19]

### **4.4 Metabolómica**

La metabolómica se ha convertido en una herramienta importante en la ciencia de los alimentos para la calidad, el procesamiento y la seguridad de materias primas y productos finales. El objetivo de la metabolómica es el estudio de “tantos metabolitos pequeños como sea posible” en un sistema.[20], [21]

El análisis metabolómico generalmente se divide en dos grupos: la metabolómica no dirigida, la cual es un análisis exhaustivo de todos los compuestos medibles en una muestra, con el fin de obtener patrones o “huellas digitales” sin ser necesario la identificación o cuantificación de un compuesto específico, mientras que la metabolómica dirigida se centra en el estudio del comportamiento de un grupo específico de compuestos en la muestra. Según el objetivo del análisis y la manipulación de los datos, los estudios metabolómicos también pueden

clasificarse como: discriminativos, donde se busca encontrar diferencias entre las poblaciones de las muestras; informativos, que se centran en la identificación y cuantificación de metabolitos dirigidos o no dirigidos para obtener información intrínseca de la muestra; y/o predictivos, en donde se crean modelos estadísticos basados en el perfil y la abundancia del metabolito para predecir una variable determinada.[21]

#### **4.4.1 Metabolómica basada en RMN para el análisis del vino.**

En las últimas décadas la RMN se ha convertido en una de las técnicas analíticas utilizadas en metabolómica, ofrece varias ventajas para la adquisición de datos, tiene una excelente selectividad y capacidad para la determinación simultánea de muchos compuestos, requiere una preparación mínima o nula de la muestra y no es destructiva. Las principales limitaciones de la técnica se relacionan con la resolución y sensibilidad, sin embargo, ambas mejoran por la adquisición de experimentos a intensidades de campo magnético altas y empleo de criosondas.[22], [23]

El análisis de RMN del vino, es complicado debido a que las señales dominantes en los espectros de RMN son las del agua y del etanol, lo cual hace que la información de los compuestos minoritarios se vea disminuida. Para expandir el rango de análisis de los compuestos minoritarios se han propuesto procedimientos de preparación de muestra para el análisis del vino. Estas técnicas incluyen procedimientos de liofilización o destilación al vacío las cuales, además de aumentar la duración y el costo del análisis causan, algunos problemas adicionales como la pérdida de algunos metabolitos.[24]–[27] Otro enfoque más atractivo es el análisis directo con el uso de la supresión de señales de agua y etanol durante la adquisición del experimento de RMN. Los métodos de supresión se basan en aplicar un pulso de baja potencia, relativamente largo, a la resonancia del disolvente (para suprimir su señal) antes de aplicar el pulso duro (usualmente  $90^\circ$ ), no selectivo con el fin de excitar las señales de todo el espectro. El 1D-NOESY-presat (*1 Dimension Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy with Presaturation*) es la secuencia de pulso más utilizada para suprimir las señales el agua de las matrices en estudios metabolómicos. Particularmente en un instrumento de marca Bruker, esta secuencia es llamada “noesypr1d”, existen estudios donde esta secuencia es combinada con una supresión múltiple de las ocho señales correspondientes al

agua y etanol mediante la aplicación de un pulso con forma (una simple al agua y siete líneas individuales correspondientes al cuarteto y triplete del etanol).[28]–[30]

El conjunto de datos espectroscópicos o de metabolitos, generalmente es analizado por métodos estadísticos multivariantes como PCA (*Principal Component Analysis*), PLS-DA (*Partial Least Squares-Discriminant Analysis*) y OPLS-DA (*Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis*). El primero es un método no supervisado que intenta modelar los datos de forma exploratoria sin utilizar ningún conocimiento *a priori*, y los últimos dos son métodos supervisados que requieren información específica de las muestras (clasificadores) para generar modelos que se centren estrechamente en los efectos de interés. Estos enfoques estadísticos se utilizan para visualizar estructuras de datos (como diferenciación, discriminación o clasificación entre grupos de muestras). Estos métodos han llevado a diferenciar con éxito la uva o los vinos según la variedad, origen geográfico y años de producción.[31]

#### 4.5 Resonancia Magnética Nuclear

En 1946, Purcell, Poun y Torrey, de la Universidad de Harvard, y Bloch, Hansen y Packard, de la Universidad de Standford, describieron conjuntamente la RMN. El descubrimiento se produjo por primera vez cuando se notó que los núcleos magnéticos como  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  eran capaces absorber energía de radiofrecuencia cuando se colocaron en un campo magnético. Tras la absorción, los núcleos comienzan a resonar a diferentes frecuencias. Desde entonces, la RMN se ha aplicado a sólidos, líquidos y gases, así como estudios cinéticos, lo que ha dado como resultado seis premios Nobel en el campo de la RMN.[32]

##### 4.5.1 Conceptos básicos

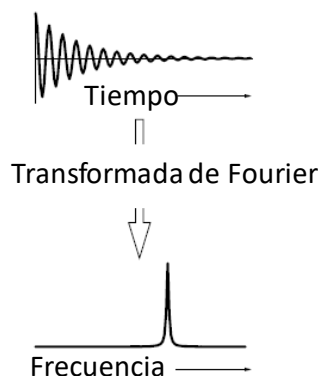
La RMN es una técnica espectroscópica que estudia la absorción y emisión de radiación electromagnética por los núcleos de los átomos que están sometidos a la influencia de un campo magnético ( $\mathbf{B}_0$ ), siendo un requisito que el número de espín de dichos núcleos sea diferente de cero.[33] Dicha absorción ocurre a frecuencias únicas que dependen del tipo de núcleo y el ambiente químico en el que se encuentra, y se manifiestan en presencia de un  $\mathbf{B}_0$  intenso y constante. Este tipo de núcleos poseen un momento angular de espín y un momento



magnético, es decir, que son magnéticamente activos, lo que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de  $\mathbf{B}_0$ , los espines nucleares se orientan al azar y son equivalentes en energía. Sin embargo, cuando se colocan en un  $\mathbf{B}_0$ , los momentos magnéticos se alinean a lo largo del  $\mathbf{B}_0$  conforme a la distribución de Boltzmann, ya sea en la misma dirección del campo en un estado de mínima energía, denominado estado de espín  $\alpha$ , o en dirección opuesta a la de  $\mathbf{B}_0$ , en un estado de mayor energía denominado como estado de espín  $\beta$ .

Los núcleos al estar alineados con  $\mathbf{B}_0$  describen un movimiento llamado precesión a una frecuencia proporcional a dicho campo, llamada frecuencia de Larmor. Esta frecuencia depende de la constante giromagnética, que es una propiedad intrínseca del núcleo. Para poder hacer que los núcleos entren en resonancia, se les aplica una radiofrecuencia, similar a la frecuencia a la que precesan, sacándolos de su equilibrio y observando la señal que generan al regresar a su estado original. La magnetización tiene la tendencia a volver al equilibrio, proceso conocido como relajación. La relajación sobre el *eje z* hasta alcanzar el equilibrio se denomina relajación longitudinal ( $T_1$ ) o espín-red, esto involucra intercambios energéticos entre los espines nucleares y su entorno molecular (red). La relajación sobre el *plano xy* es llamada relajación transversal ( $T_2$ ) o de espín-espín, que involucra intercambios energéticos entre espines a través de los enlaces. La señal generada tras aplicar la radiofrecuencia eventualmente se desvanecerá debido a la relajación; por lo tanto, la señal se denomina decaimiento de inducción libre o FID (por sus siglas en inglés), esta señal es dependiente del tiempo. Mediante un proceso matemático, conocido como transformada de Fourier, la función de dominio de tiempo (el FID) es convertida a una función del dominio de las frecuencias (el espectro) Figura 1.



**Figura 1 Esquema de la conversión de la FID en un espectro de RMN**

El  $^1\text{H}$ , es uno de los núcleos más estudiados debido a su gran abundancia en la naturaleza, además de que posee una constante giromagnética grande. El equipo con el que es detectado el fenómeno de RMN es un espectrómetro, que consta de varias partes, de las cuales las más importantes son: un imán superconductor, que genere un campo magnético intenso, una sonda compuesta de bobinas de excitación y detección de los espines nucleares, un transmisor de pulsos de radiofrecuencia para generar la excitación de los núcleos, un amplificador para aumentar la respuesta, un filtro digital para convertir la señal en información y finalmente una computadora para controlar el sistema de procesamiento de la señal.[34]

#### 4.6 Espectro de RMN

Los espectros de RMN contienen información estructural característica de cada metabolito presente en las muestras. En un espectro de RMN el desplazamiento químico ( $\delta$ ) o posición de las señales es una propiedad importante ya que cada conjunto de núcleos magnéticamente diferentes da origen a una señal única, la cual nos brinda información sobre la composición de los grupos atómicos dentro de la molécula. La constante de acoplamiento ( $J$ ) spin-spin, nos brinda información sobre átomos adyacentes ya que es el resultado del acoplamiento de los espines nucleares, este acoplamiento proporciona otro parámetro importante en el espectro de RMN como la forma de las señales, conocido como multiplicidad, la cual es el resultado de los acoplamientos entre espines nucleares de núcleos vecinos. El área de la señal de resonancia es proporcional al número de núcleos que producen esa señal, la cuál es la propiedad que provee a la RMN como una técnica cuantitativa.

## 4.7 Quimiometría

El término quimiometría se acuñó en el año de 1970 por Svante Wold y Bruce R. Kowalski y está definida como la disciplina de la química que hace el uso de las matemáticas, estadística y otros métodos para proveer el máximo de información relevante del análisis de datos químicos. Su desarrollo estuvo de la mano con la computación científica y se dedicó principalmente al uso de métodos estadísticos multivariados para el análisis de datos bastante simples en química analítica. En la actualidad los instrumentos analíticos tienen una gran capacidad para adquirir grandes cantidades de datos rápidamente, tal como la espectroscopia de RMN. Los métodos de reconocimiento de patrones para el análisis de datos de RMN tratan el espectro como un objeto estadístico, en el cual las intensidades espectrales representan una “huella metabólica” n-dimensional. Las intensidades de las señales en un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN pueden puntuarse usando una escala relativa simple que indica aumentos o disminuciones menores a mayores en las intensidades. El análisis exploratorio de datos consiste principalmente en las técnicas de Análisis de Componentes Principales (PCA). La idea central del PCA es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos que consta de grandes cantidades de variables interrelacionadas, manteniendo la máxima variación del conjunto de datos. En este modelo las combinaciones lineales de variables (las intensidades espectrales) con factores de ponderación apropiados producen una nueva variable conocida como el componente principal (CP). Cada CP es ortogonal o no correlacionado con todos los otros CP. Este es un enfoque “no supervisado” en el que no se asume ningún conocimiento previo del sistema. Los CP se trazan entre sí (en una gráfica de *scores*) para mostrar patrones o grupos dentro de los datos.[35] Los métodos supervisados, están definidos por dos conjuntos de datos, objetos (entrada) y clases (objetivo) intentan descubrir una relación entre objetos y clases, denominado modelo, que representa un conjunto de características que definen el proceso de clasificación. La pertenencia de nuevos objetos (incógnitas para los modelos) se predice en función de su similitud con una determinada clase en el modelo.[36]

## Metodología

### 5 Metodología

#### 5.1 Muestras de vino

Se compraron cuatro botellas de vino tinto Cabernet Sauvignon de Baja California (B.C.) cuyas características se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Características de los vinos Cabernet Sauvignon.**

Región de procedencia	Casa productora	Edad	Clave	Año de cosecha	% Alcohol % v/v	Lote
Valle de Guadalupe, B.C.	La Cetto	Joven	LC	2016	13.5	L1A718361
	Monte Xanic	Crianza	MX	2017	13.9	CS17
Valle de Santo Tomas, B.C.	Santo Tomás	Joven	ST12	2015	12.8	L581STCI717
	Santo Tomás	Crianza	ST13		13.4	L15882CSVJO

#### 5.2 Condiciones de almacenamiento

Una vez abierta la botella, se analizó la primera muestra con el fin de tener un espectro de referencia a tiempo “cero”, y se llenaron tubos cónicos para centrifuga de 15 mL. Con el fin de observar si hay alguna influencia en la cantidad de aire en los tubos, estos fueron llenados con diferentes volúmenes de vino, por cuestiones prácticas esto se le denominara como “nivel de llenado”.

##### 5.2.1 Nivel de llenado

Los tubos se llenaron a ras del borde, hasta observar el menisco en la parte superior del tubo y se cerró lentamente observándose un burbujeo.

Se obtuvieron tres grupos de tubos con muestra a diferente nivel de llenado (N); llenos al 100% (N<sub>100</sub>, Figura 2b) que contenían una mínima cantidad de aire al interior, llenos al 97% (N<sub>97</sub>, Figura 2a) y llenos al 50% de su capacidad (N<sub>50</sub>, Figura 2c).

El tipo de vino usado para el llenado y el número total de tubos para cada grupo se presentan en la Tabla 3, todos los tubos se almacenaron posteriormente a 3 diferentes temperaturas.

## Metodología

**Tabla 3. Clasificación y número de tubos llenos con muestras de vino.**

N	Clave	Total de tubos	Observaciones
100%	ST13	33	Tubo lleno totalmente
97%	MX	156 (39 muestras por cada vino)	Al menos 0.5 mL del tubo sin llenar
	LC		
	ST12		
	ST13		
50%	ST13	21	Llenos a la mitad de la capacidad del tubo

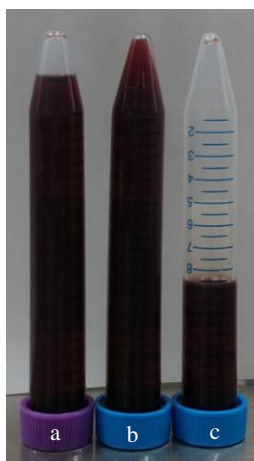


Figura 2. Comparación de volumen de vino al interior del tubo de a) 97% b) 100% y c) 50%

### 5.2.2 Condiciones de almacenamiento

Los grupos de tubos descritos en la sección anterior se utilizaron para el estudio de la evolución del vino en función de la temperatura, para esto se almacenaron a tres temperaturas, dos extremas 4 °C (baja) y 40 °C (alta) y una intermedia de 20 °C.

Para la temperatura baja, las muestras se almacenaron en un refrigerador, el cual tuvo una temperatura promedio al interior de  $4 \pm 1$  °C. Para la temperatura intermedia los tubos se mantuvieron en un cuarto a una temperatura controlada de 20 °C. Por último, para la temperatura más alta los tubos fueron almacenados en una estufa a una temperatura constante de 40 °C. Aunado a lo anterior, todos los tubos fueron cubiertos de cualquier fuente de luz.

### 5.2.3 Tiempo de almacenamiento

## Metodología

El monitoreo de las muestras se realizó tomando un tubo de cada vino por cada temperatura y realizando la adquisición de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Para el caso de N<sub>97</sub> a los días 1, 2, 3, 4, y las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9; para N<sub>100</sub> los días 1, 2, 3 y las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8; y para N<sub>50</sub> los días 1, 2, 3 y las semanas 1, 2, 3 y 4.

### 5.3 Análisis por RMN

#### 5.3.1 Preparación de la disolución del estándar de referencia

Para la disolución del estándar de TSP se prepararon 30 mL de una solución de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$  99.9 atom % D, Cambridge Isotope Laboratories) con 30.342 mg de sal TSP (98 atom % D, Merck), obteniendo una concentración de 5.75 mM.

#### 5.3.2 Preparación de las muestras

En un tubo eppendorf de 2 mL se transfirieron 900  $\mu\text{L}$  del vino y 100  $\mu\text{L}$  de la disolución con el estándar de TSP, se homogeneizó en vortex durante 30 s, se tomaron 600  $\mu\text{L}$  de esta disolución y se transfirieron en un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.

#### 5.3.3 Adquisición de espectros de RMN

Los experimentos se adquirieron en un espectrómetro Bruker Avance III HD de 700 MHz para  $^1\text{H}$  (campo magnético de 16.44 T, Figura 3), equipado con una sonda criogénica con tres canales para  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  con bobina de gradientes en el eje z y un automuestreador “SampleJet” con capacidad mayor a las 500 muestras.

## Metodología



**Figura 3. Espectrómetro Bruker Avance III HD 700 MHz (campo de 16.4 T).**

Los espectros se adquirieron mediante la secuencia de pulsos de un  $^1\text{H}$ -RMN de la librería de Bruker “noesygppr1d”, que involucra la supresión de las señales de agua y etanol.

Los parámetros de adquisición fueron los siguientes: retardo entre pulsos (**D1**): 4s, tiempo de adquisición (**AQ**): 3.99 s, tiempo de mezclado (**d8**): 0.01 s, número de transientes (**NS**): 32, tamaño de la FID (**TD**): 655536 puntos, ventana espectral (**SW**): 14 a -5 ppm.

### 5.3.4 Procesamiento de espectros

El procesado de los espectros se realizó con el software TopSpin (versión 3.5, Bruker) con el cual se corrigió la fase y línea base de forma automática exponencial de 0.3 Hz. Los espectros se referenciaron a 0.0 ppm con TSP y se normalizaron a la señal de la prolina (al multiplete en 2.3 ppm del  $\text{CH}_2$ ) con el software MestRenova (versión 12.0.0, Mestrelab ResearchS.L.).

### 5.3.5 Identificación de metabolitos

La identificación y asignación de la mayoría de las señales de los metabolitos, se realizó de acuerdo con desplazamientos químicos previamente reportados, y algunos con ayuda del software Chenomx (versión 8.3; Chenomx Inc.).[37]

## Metodología

### 5.4 Análisis quimiométrico

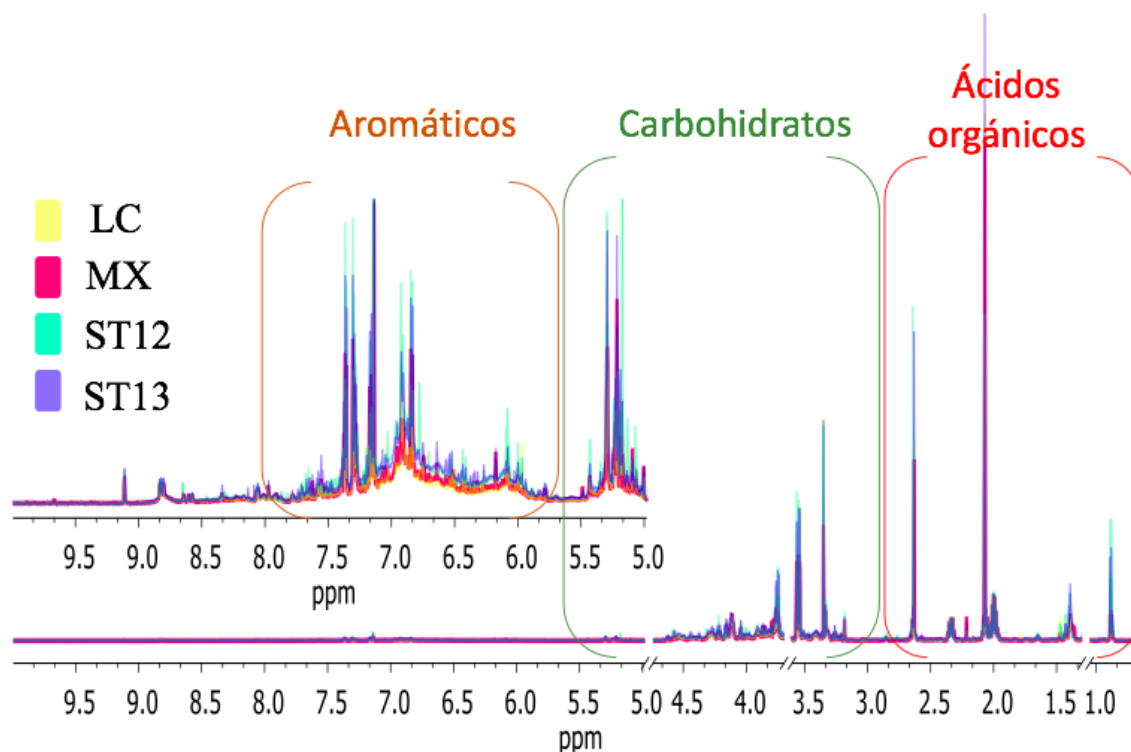
Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN obtenidos de las muestras se preprocesaron con el software Chenomx NMR Suite (versión 8.3; Chenomx Inc.), ensanchamiento de línea exponencial (*line broadening*, LB) de 0.5 Hz y una corrección automática de la fase. Con el fin de reducir la dimensionalidad de los datos obtenidos, se realizó el *binning*, por generación de cajas homogéneas, con un tamaño de 0.04 ppm en el rango de 10.75 a -1 ppm, excluyendo las señales de agua (4.98-4.74 ppm) y etanol (1.30-1.05, 3.70-3.60 ppm), finalmente se extrajo la matriz y se guardaron los datos con formato “csv (delimitado por comas)”. Con el software Excel (versión 2016, Microsoft®) se modificó la matriz incluyendo cuatro columnas cualitativas con un identificador secundario numérico que representaba la casa productora, el nivel de llenado, la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Los datos obtenidos fueron exportados al programa SIMCA (versión 16.0, Umetrics) donde se realizaron análisis de PCA con un escalado tipo Pareto sobre el total de las muestras con el fin de encontrar tendencias en función de las condiciones de almacenamiento.



## 6 Resultados y discusión

### 6.1 Espectro de RMN e identificación de metabolitos

En la Figura 4 se encuentran sobrepuestos los espectros de los cuatro vinos analizados al momento de abrir la botella. En los espectros se indican las regiones de desplazamiento químico en donde se hallan las señales correspondientes a los tres grupos principales de compuestos orgánicos que conforman de manera general el perfil espectral típico del vino tinto, estas zonas corresponden de 8 a 6 ppm para los compuestos aromáticos, de 5.5 a 3 ppm para los carbohidratos y de 2.5 a 1.5 ppm ácidos orgánicos. Para una mejor visualización de la región aromática se ha hecho una expansión y multiplicado por un factor de 20x.

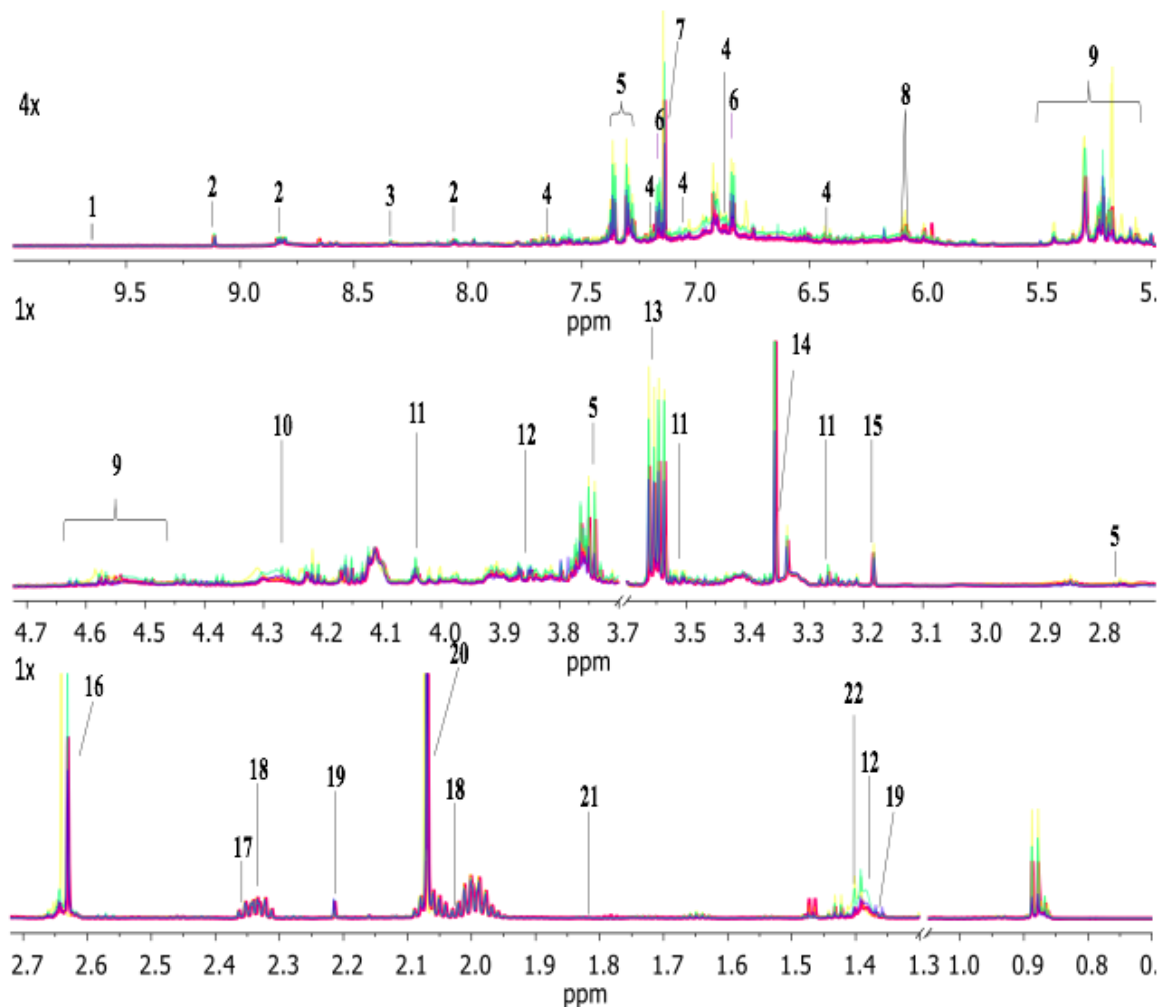


**Figura 4. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, D<sub>2</sub>O, 300 K) sobrepuestos de las muestras control de los cuatro tipos de vino, región aromática multiplicada por un factor de 20x.**

La Figura 5 muestra la identificación de los metabolitos sobre los espectros de los cuatro vinos. Los valores de desplazamiento químico de las señales en cada uno de los vinos son ligeramente distintos, esto se debe a que esta propiedad depende directamente del valor de pH (el cual no fue regulado). Las intensidades en las señales de los metabolitos muestran

## Resultados y discusión

diferencias, debido a que las concentraciones de estos son el resultado de la contribución de diversos factores propios de cada vino. La identificación de los metabolitos se hizo en todos los vinos, como ejemplo en la Tabla 4 se muestran los 22 metabolitos identificados en el vino ST13 con su asignación, sus desplazamientos químicos, la multiplicidad y las constantes de acoplamiento (*J*).



**Figura 5.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) de las muestras de vino LC (amarillo), MX (rosa), ST12 (verde agua) y ST13 (azul) tomados al momento de apertura de botella. Metabolitos identificados : 1. Acetaldehído, 2. Trigonelina, 3. Ácido fórmico, 4. Ácido cafeico, 5. Alcohol fenílico, 6. Tirosina, 7. Ácido gálico, 8. Epicatequina, 9. Azúcares, 10. Ácido láctico, 11. Mio-inositol, 12. Manitol, 13. Glicerol, 14. Metanol, 15. Colina, 16. Ácido succínico, 17. Ácido pirúvico, 18. Prolina, 19. Acetoína, 20. Ácido acético, 21. GABA, 22. Alanina.

## Resultados y discusión

**Tabla 4. Metabolitos identificados en las muestras de vino tinto ST13. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ), multiplicidad, constantes de acoplamiento ( $J$ ) y asignación usados para la identificación**

No.	Compuesto	$\delta_{1H}$ en ppm (multiplicidad, $J$ en Hz, asignación)
1	Acetaldehído/Etanal	9.67(q, 2.98, CH); 2.23(d, 2.94, CH <sub>3</sub> )
2	Trigonelina	9.11(s, COOH); 8.83(d, 8.10, CH); 8.80(d, 6.10, CH); 8.05(t, CH), 4.42(s, CH <sub>3</sub> )
3	Ácido fórmico	8.33(s, CH <sub>3</sub> )
4	Ácido cafeico	7.66 (d, 16.0, CH); 7.21 (d, CH); 7.06 (dd, CH) 6.87(d, 8.3, CH); 6.43(d, 16.1, CH)
5	Alcohol fenetílico	7.32(m, CH); 7.30(m, CH); 3.75(CH <sub>2</sub> OH); 2.77(CH <sub>2</sub> )
6	Tirosina	7.17(m, 2CH); 6.84(m, 2CH)
7	Ácido gálico	7.14(s, 2CH)
8	Epicatequina	6.10(d, 2.2, CH); 6.07(d, 2.3, CH)
9	Azúcares	5.5-4.5
10	Ácido láctico	4.37(q, CH); 1.39(d, 7.0, CH <sub>3</sub> )
11	Mio-inositol	4.04(t, 3.02, CH), 3.52 (dd, 9.98, 2.85, CH), 3.26(t, 9.37, CH)
12	Manitol	3.86(dd, 2.9 y 11.8, CH <sub>2</sub> )
13	Glicerol	3.55(dd, 11.4 y 6.4, CH <sub>2</sub> )
14	Metanol	3.35(s, CH <sub>3</sub> )
15	Colina	3.18(s, 3CH <sub>3</sub> )
16	Ácido succínico	2.63(s, CH <sub>2</sub> )
17	Ácido pirúvico	2.3(s, CH <sub>3</sub> )
18	Prolina	4.11(dd, CH <sub>2</sub> ), 3.4(ddd, CH <sub>2</sub> NH), 2.3(m, CH <sub>2</sub> ), 2.0(m, CH <sub>2</sub> )
19	Acetoína	4.40(q, 6.7, CH <sub>3</sub> OH), 2.2(s, CH <sub>3</sub> ); 1.37(d, 7.1, CH <sub>3</sub> )
20	Ácido acético	2.07(s, CH <sub>3</sub> )
21	GABA	1.83(m, CH <sub>2</sub> ); 0.87(t, 7.1, CH <sub>3</sub> )
22	Alanina	1.40(d, 7.1, CH <sub>3</sub> )

### 6.2 Cambios observados en las muestras preparadas en un lapso no mayor a 12 h.

En la Figura 6 se presenta una ampliación en la región de 4.7 a 4.18 ppm de los espectros de <sup>1</sup>H-RMN de las 3 muestras preparadas y analizadas de cada vino por duplicado en un lapso no mayor a 12 h. En 4.52 ppm se observa el incremento en la intensidad de una señal ancha, que en la muestra ST12 el aumento fue mayor, seguido de MX y ST13, mientras que en LC

## Resultados y discusión

no se observó este cambio. En 4.28 ppm en la muestra del vino LC se observa una señal en forma de cuarteto, la cual para los demás vinos parece estar solapada y para el caso de ST12 y ST13 hay un incremento en intensidad. Las señales anchas antes mencionadas no pudieron ser identificadas y se considera que conocer este comportamiento es muy importante para no atribuirlo a las condiciones de almacenamiento, ya que ocurren en el tubo de RMN en el lapso de una jornada de trabajo.

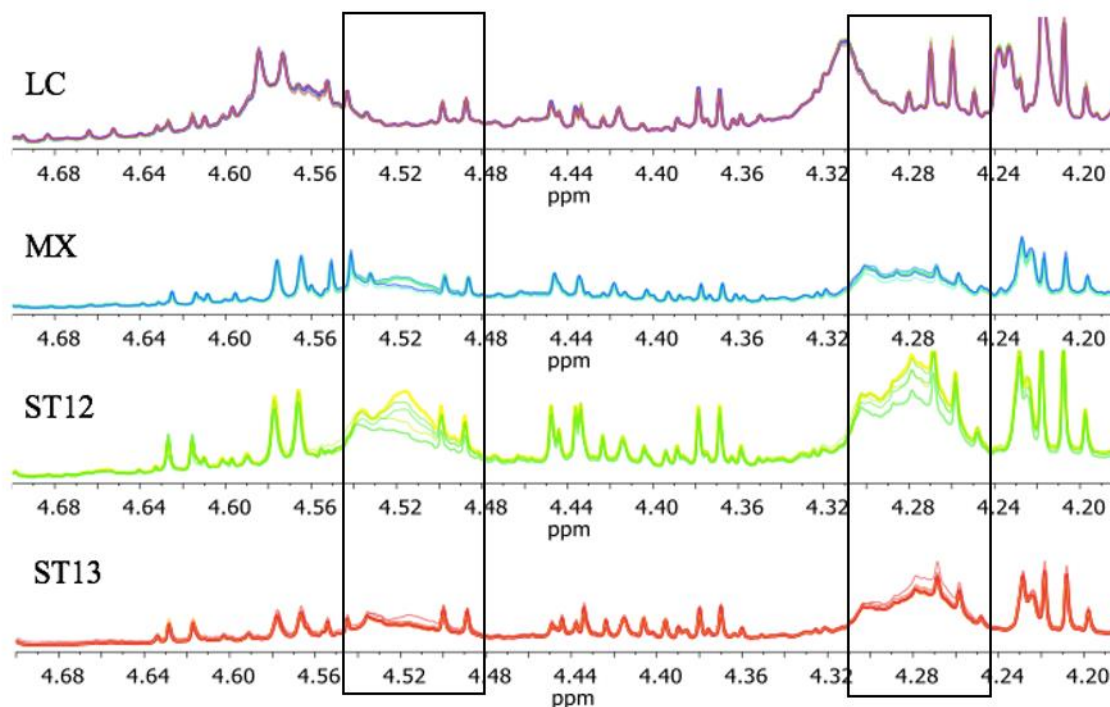
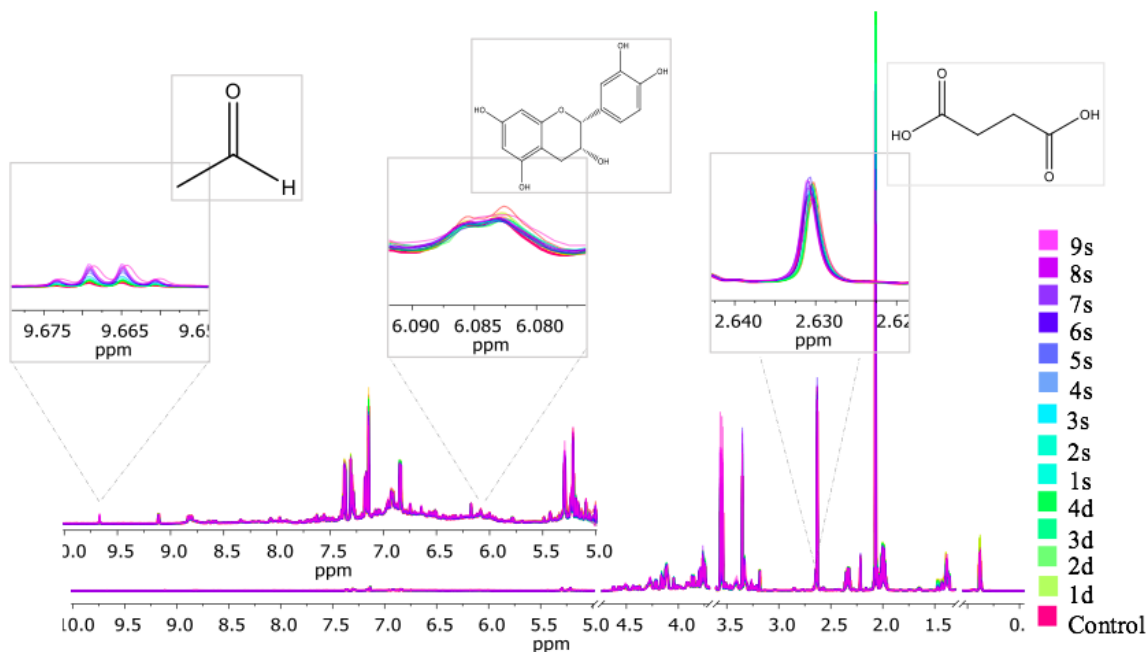


Figura 6. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) sobrepuestos de 3 muestras de cada vino analizadas dos veces cada una de forma aleatoria en un lapso no mayor a 12 h.

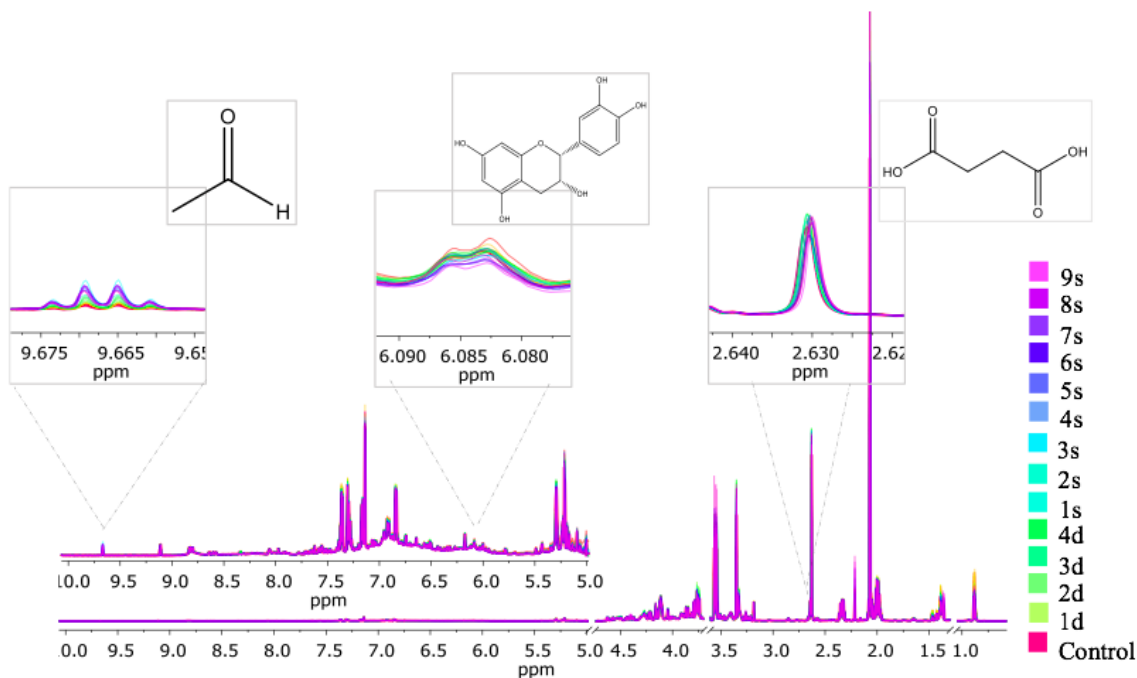
### 6.3 Estudio de los cambios en el metaboloma en función del tiempo y temperatura.

Se muestran los espectros de las muestras de vino ST13 almacenadas a 4 °C (Figura 7), 20 °C (Figura 8) y 40 °C (Figura 9) en donde se observa el cambio en el perfil metabolómico de las muestras almacenadas. De forma general los cambios son en la intensidad (aumento y disminución) y en el desplazamiento químico, como se puede ver en las expansiones realizadas en las figuras de las señales de tres metabolitos (acetaldehído, epicatequina y ácido succínico) y cuyo comportamiento se discutirá con detalle más adelante.

## Resultados y discusión

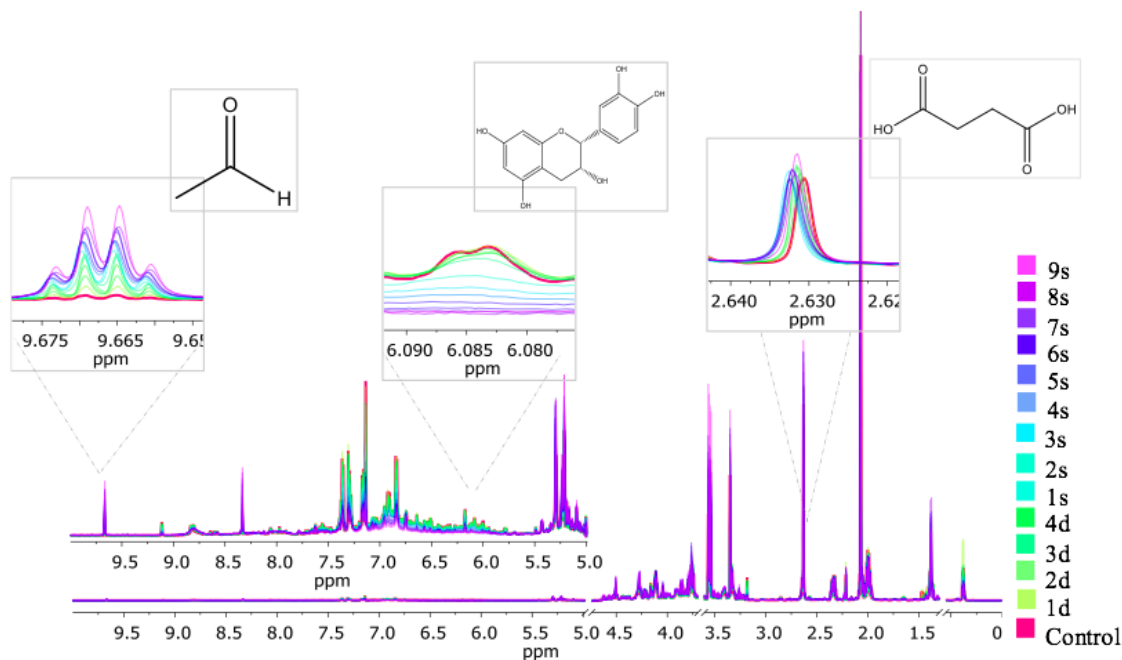


**Figura 7.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) sobrepuestos de las muestras de vino ST13 almacenadas a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  desde el tiempo inicial y hasta la novena semana (9s). Se realizaron expansiones de las señales de acetaldehído, epicatequina y ácido succínico.



**Figura 8.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) sobrepuestos de la muestra de vino ST13 almacenadas a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  desde el tiempo inicial y hasta la novena semana (9s). Se realizaron expansiones de las señales de acetaldehído, epicatequina y ácido succínico.

## Resultados y discusión

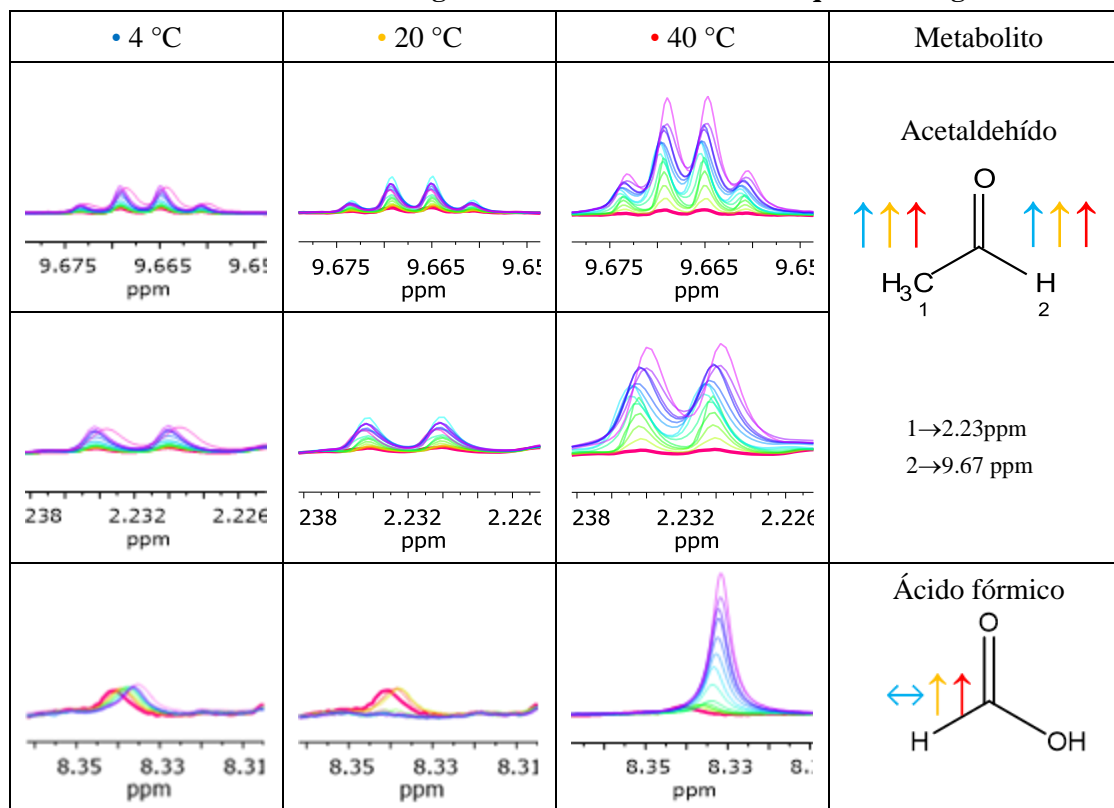


**Figura 9. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 K) sobrepuestos de la muestra de vino ST13 almacenado a 40 °C desde el tiempo inicial y hasta la novena semana (9s). Se realizaron expansiones de las señales de acetaldehído, epicatequina y ácido succínico.**

Las cantidades de acetaldehído y ácido fórmico en el vino son comúnmente bajas, ambos son subproductos de la fermentación debido a la oxidación de alcoholes, por lo cual los cambios observados en las señales correspondientes a estos metabolitos durante el almacenamiento pueden ser manifestación de procesos de oxidación. En la Tabla 5 se presentan las señales correspondientes a dichos metabolitos, en primer lugar, se encuentra el cuadruplete del CH unido al carbonilo en 4.67 ppm y el doblete del  $\text{CH}_3$  en 2.3 ppm del acetaldehído. Al comparar los espectros se observa que durante el almacenamiento hay un aumento progresivo en la intensidad de las señales del acetaldehído a todas las temperaturas. La señal del ácido fórmico (singlete en 8.33 ppm) tuvo un comportamiento particular para cada temperatura, a 4 °C solo tuvo cambios en el desplazamiento químico, pero no en intensidad, a 20 °C la intensidad fue disminuyendo hasta no ser detectada a partir de la segunda semana de almacenamiento, y a 40 °C hubo un incremento de la intensidad al aumentar el tiempo.

## Resultados y discusión

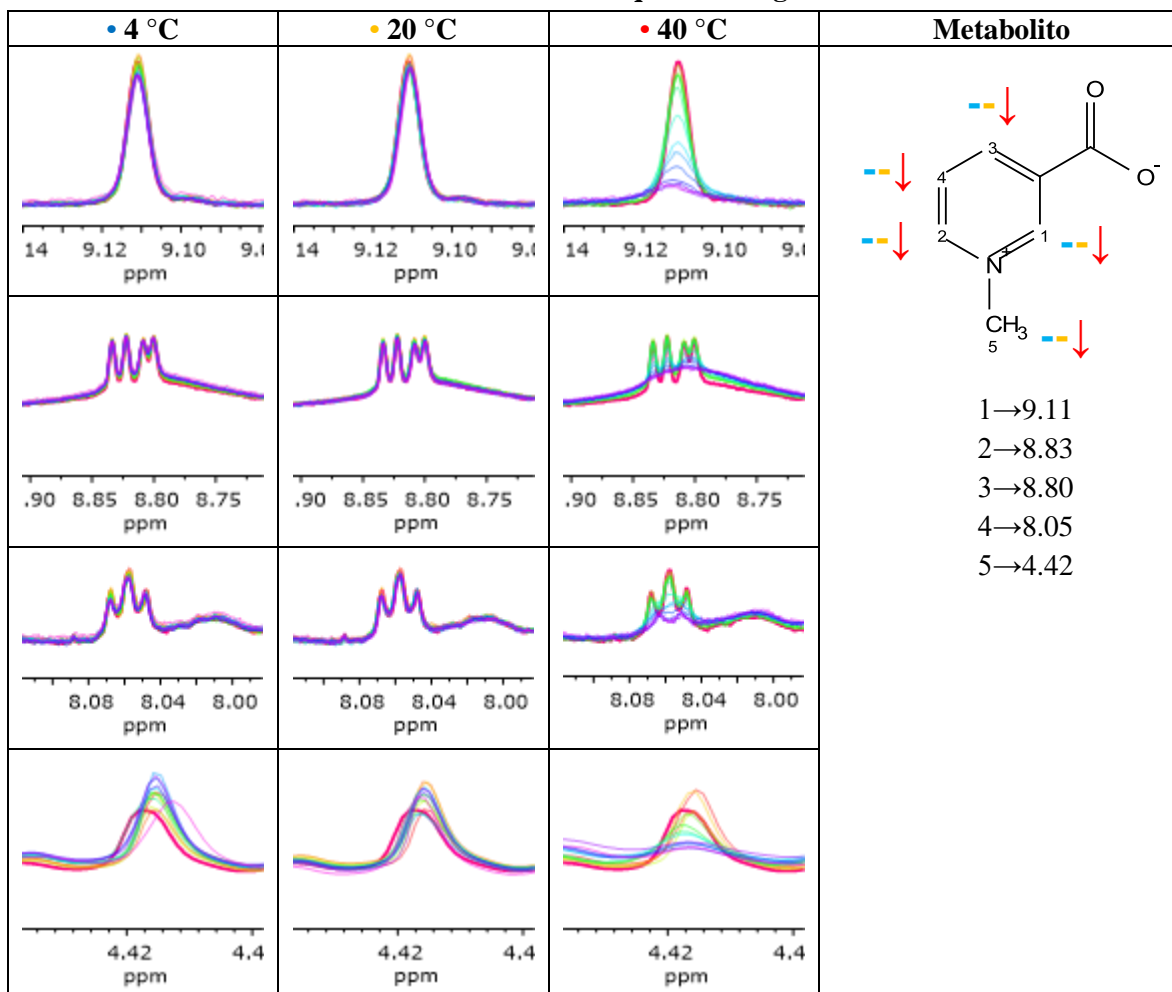
**Tabla 5. Ampliación a las señales de los metabolitos de acetaldehído y ácido fórmico en los espectros apilados de las muestras ST13 almacenadas en las diferentes condiciones de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la Figura 7**



En la Tabla 6 se muestran las señales de la trigonelina. A 4 y 20 °C no se observaron cambios en sus señales, a diferencia de 40 °C en donde, conforme el tiempo aumenta hay una disminución en la intensidad de los singletes del CH aromático (9.11 ppm) y del CH<sub>3</sub> (4.42 ppm), así como pérdida de la multiplicidad en los dos dobletes (8.83 y 8.80 ppm) y el triplete (8.05 ppm).

## Resultados y discusión

**Tabla 6. Ampliación a las señales de los metabolitos de trigonelina en los espectros apilados de la muestra ST13 almacenadas en las diferentes condiciones de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la Figura 7**



En la Tabla 7 se muestran las señales de los compuestos fenólicos identificados: ácido cafeico, ácido gálico, y epicatequina, estos compuestos se conforman principalmente de un anillo aromático y grupos hidroxilo como sustituyentes, los protones del grupo OH no se observan ya que son intercambiables con el deuterio del medio. A 4 y 20 °C no se presentaron cambios, a 40 °C todas las señales de dichos compuestos disminuyeron y presentaron cambios en el desplazamiento químico al incrementar el tiempo, posiblemente debido a la susceptibilidad de los grupos carboxilo a protonarse o desprotonarse según el pH del medio, el cual como ya se había mencionado antes, no fue regulado.



## Resultados y discusión

**Tabla 7. Ampliación a las señales de los metabolitos identificados como fenólicos en los espectros apilados de la muestra ST13 almacenadas en las diferentes condiciones de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la figura Figura 7**

• 4 °C	• 20 °C	• 40 °C	Metabolito
			<b>Ácido caféico</b> 1→7.66 2→7.21 3→7.06 
			<b>Ácido gálico</b> 
			<b>Epicatequina</b> 

En la Tabla 8 se observa el comportamiento del ácido láctico y la colina. Para el ácido láctico las señales mostraron ciertos cambios en el perfil, sin embargo, esto no es claro debido al solapamiento con otras señales desconocidas, este es el caso en la región donde se encuentra el CH en 4.38 ppm donde un doblete ancho incrementa en intensidad, además en la región donde se encuentra el CH<sub>3</sub> en 1.39 ppm se observa la contribución de varias señales. En

## Resultados y discusión

cuanto a la colina, no hay cambios a 4 y 20 °C, pero a 40 °C se observó que la señal del singlete de los metilos disminuye conforme al tiempo de almacenamiento.

**Tabla 8. Ampliación a las señales de los metabolitos de ácido láctico y colina en los espectros apilados de las muestras ST13 almacenadas en las diferentes condiciones de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la figura Figura 7**

• 4 °C	• 20 °C	• 40 °C	Metabolito
			<p><b>Ácido láctico</b></p> <p>1→1.39</p> <p>2→4.38</p>
			<p><b>Colina</b></p>

En la Tabla 9 se presentan las señales identificadas de la acetoína. A 4 y 40 °C no presentaron cambios significativos en cuanto a la intensidad de las señales, sin embargo a 4 °C el singlete del CH<sub>3</sub> adyacente al grupo carbonilo (2.21 ppm) tuvo una variación de desplazamiento químico de hasta 0.001 ppm (0.864 Hz) a las 9 semanas, además se observó la aparición de otro singlete no identificado en 2.22 ppm. Por otro lado, a 20 °C las señales tuvieron un incremento gradual en la intensidad a partir de la tercer semana. Con respecto a los otros tipos de vino, se observó que en las muestras de MX y ST12 las intensidades de las señales de acetoína fueron constantes para todas las temperaturas estudiadas.

## Resultados y discusión

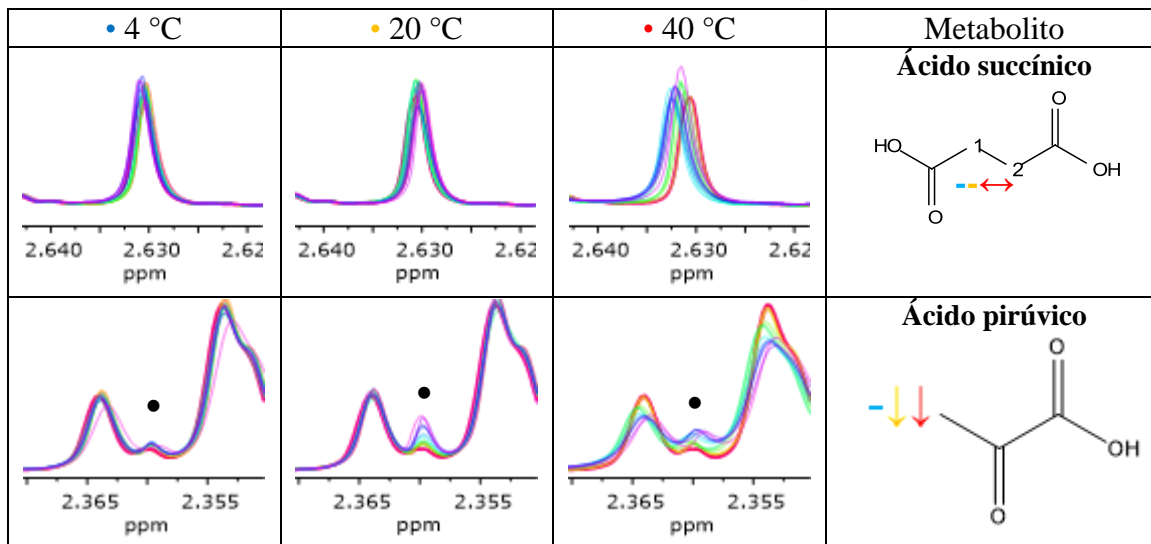
**Tabla 9. Ampliación a las señales de los metabolitos de acetoína en los espectros apilados de la muestra ST13 almacenadas en las diferentes condiciones de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la figuraFigura 7**

• 4 °C	• 20 °C	• 40 °C	Metabolito
			Acetoína 1→2.2 2→1.37 3→4.40

En la Tabla 10 se muestran las señales de los ácidos succínico y pirúvico. La señal del ácido succínico en 2.63 ppm, que corresponde a los protones de los carbonos adyacentes a los grupos de ácido carboxílico, tuvo variaciones en el desplazamiento químico hasta de aproximadamente 0.002 ppm (1.24 Hz, a las 9 semanas y 40 °C), esta variación fue mayor que para los otros metabolitos que también presentaron cambios en el desplazamiento químico. El singlete del ácido pirúvico a 4 °C no tuvo variaciones, a 20 °C aumenta en intensidad y a 40 °C parece tener variaciones en desplazamiento e intensidad, sin embargo, esto es difícil de confirmar ya que la señal se encuentra entre señales de otros metabolitos de mayor intensidad que también sufren cambios a 40 °C.

## Resultados y discusión

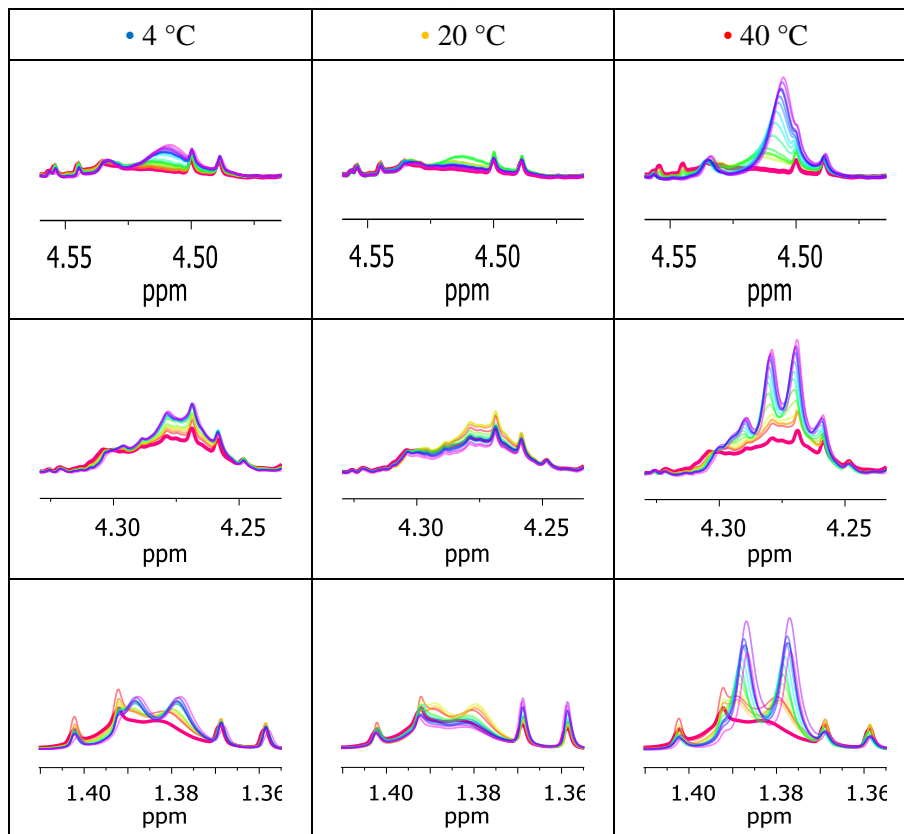
**Tabla 10. Ampliación a las señales de los metabolitos de ácido succínico y pirúvico en los espectros apilados de la muestra ST13 almacenadas en las diferentes condiciones de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la figura Figura 7**



En la Tabla 11 se presentan tres regiones en donde aparecen las señales anchas, dos de ellas (4.55-4.50 ppm) y (4.30-4.25 ppm) que fueron mencionadas en la **Figura 6**; y otra entre 1.36 y 1.40 ppm. A 40 °C el incremento en estas señales es muy notorio, aparentemente se convierte en un singlete, un cuarteto y un doblete anchos, mientras que a 20 °C las señales aumentan hasta al menos la segunda semana (línea azul) para luego disminuir hasta el nivel que tenían en los espectros control (línea roja). El comportamiento para 4 °C es similar que al de 40 °C, sin embargo, el aumento es menor en el mismo tiempo. Llama la atención que estas señales son anchas y poco definidas, lo que sugiere que una limitada movilidad molecular.

## Resultados y discusión

**Tabla 11. Comportamiento de las señales no identificadas en 1.38, 4.51 y 4.28 ppm, con respecto a la temperatura y tiempo de almacenamiento. Los códigos de colores son los mismos que en la figura Figura 7**



### 6.4 Estudio de cambios en el metaboloma en relación de la cantidad de aire.

En la Tabla 12 se hace la comparación de las señales correspondientes a los metabolitos involucrados en el proceso de oxidación de las muestras almacenadas a las tres temperaturas estudiadas en los tubos con NLL 100% y 50%. El acetaldehído, en ambos casos (NLL de 100% y 50%) se observa un incremento progresivo en la intensidad de la señal (cuarteto en 9.67 ppm) al aumentar el tiempo y la temperatura ligeramente mayor en los tubos NLL 50%. Para el ácido fórmico, a 4 °C se observa el mismo comportamiento, un incremento en la intensidad de las señales conforme al tiempo, sin embargo, a 20 °C, en NLL 100% la señal decrece, mientras que en NLL 50% aumenta y se desplaza, y para 40 °C a tiempos de almacenamiento largos el incremento en NLL 50% es mayor que para las de NLL 100%. Por otro lado, en la Tabla 13 se muestran las señales del ácido succínico, donde se observa que las variaciones en el desplazamiento químico de las señales son ligeramente mayores en las

## Resultados y discusión

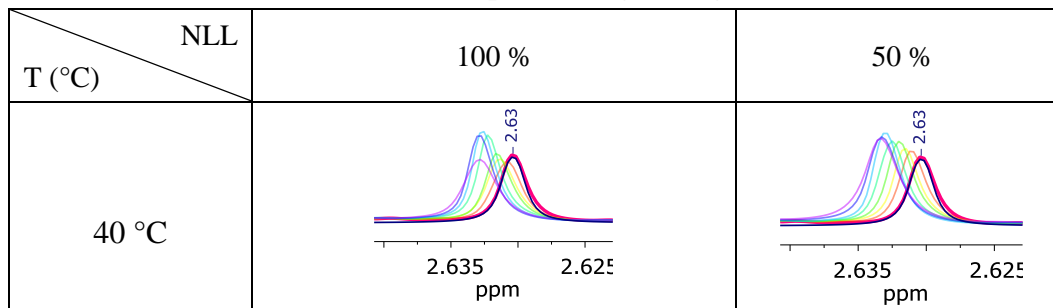
muestras con NLL 50%, ya que para las muestras con NLL 100% la variación entre la señal a tiempo 0 (línea roja) y a la novena semana (línea morada) es de aproximadamente 0.002 ppm (1.673 Hz) mientras que para las muestras en NLL 50% es de 0.003 ppm (2.194 Hz). Los cambios en las demás regiones del espectro son similares, siendo la temperatura el parámetro de mayor impacto en las variaciones de los perfiles espectrales.

**Tabla 12. Comparación de las señales de acetaldehído y ácido fórmico de muestras almacenadas con niveles de llenado (NLL) de 100 % y 50 % a las temperaturas de 4, 20 y 40 °C. Los códigos de colores son los mismos que en la figura Figura 7.**

NLL T (°C)	100%	50%	Metabolito
4			Acetaldehído 
20			
40			
4			Ácido fórmico 
20			
40			

## Resultados y discusión

**Tabla 13. Comparación de la señal del ácido succínico de muestras almacenadas con niveles de llenado (NLL) de 100 % y 50 % a las temperaturas de 4, 20 y 40 °C. Los códigos de colores son los mismos que en la figura Figura 7**



### 6.5 Cambios físicos durante almacenamiento.

Además de las variaciones en los perfiles espectrales, después del almacenamiento a 40 °C se presentaron cambios físicos. En la Figura 10 se presenta la foto de los tubos utilizados para el análisis de RMN de las muestras de un vino recién abierto y otro almacenado a 40 °C. Se observa que el tubo de la muestra almacenada a 40 °C presentó un precipitado en el fondo y cambio a un color marrón. El precipitado en los tubos es evidencia de que a 40 °C y a tiempos largos de almacenamiento las muestras no eran homogéneas, lo que se traduce en espectros de  $^1\text{H}$ -RMN donde todas las señales son más anchas.

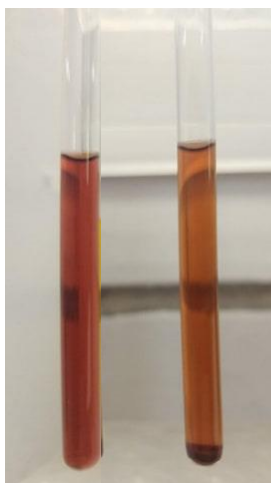


Figura 10. Tubos de resonancia con muestras de vino recién abierto (izquierda) y almacenado a 40 °C durante 9 semanas (derecha).

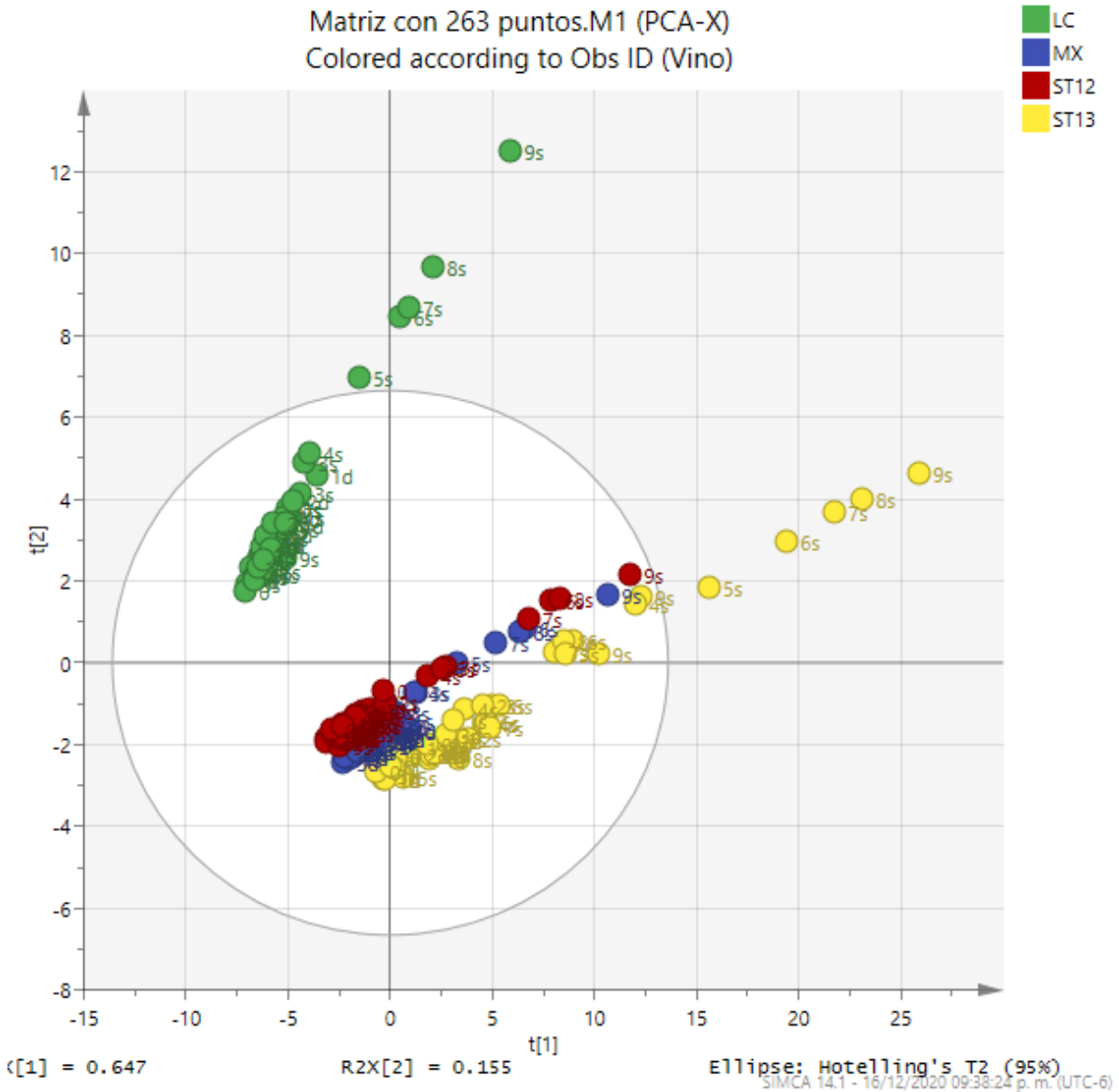
## Resultados y discusión

### 6.6 Análisis quimiométrico.

En la Figura 11 se muestra el gráfico de PCA, en el que se visualiza si hay o no la existencia de una diferenciación o tendencia entre las muestras. En el PCA los “puntos o *scores*” representan cada una de las muestras (LC, MX, ST12 y ST13) almacenadas a los diferentes tiempos (desde el momento de abrir la botella y hasta la novena semana) y temperaturas (4, 20 y 40 °C). En el PCA de la Figura 11 los *scores* se colorearon de acuerdo con el tipo de vino, y aunque solo son 4 muestras se puede inferir que el vino LC se encuentra más alejado de las demás muestras, encontrándose en el cuadrante superior izquierdo, mientras que los vinos MX, ST12 y ST13 se encuentran en los cuadrantes inferiores. Las etiquetas de los *scores* muestran el tiempo de almacenamiento y se observa claramente que hay un cambio en PC1 y PC2 conforme el tiempo aumenta, para LC y ST13 a partir de la quinta semana los *scores* salen de la elipse T2 de Hotelling (95%) mientras que, para las otras muestras, MX y ST12 esto no sucede, con lo cual se puede decir que para LC y ST13 el perfil espectral sufrió cambios más significativos. En la Figura 12 los *scores* del PCA fueron coloreados conforme a la temperatura, la distancia entre las muestras sin almacenamiento (tiempo 0), y las almacenadas a 4 y 20 °C fue cercana durante las primeras tres u ocho semanas dependiendo el tipo de vino, mientras que el distanciamiento de las muestras almacenadas a 40 °C se mantiene cercana solo durante la primer o tercera semana, dependiendo del tipo de vino. Con los datos obtenidos en este trabajo se podrían realizar otros estudios quimiométricos para poder separar la temporalidad del efecto de las diferentes temperaturas.

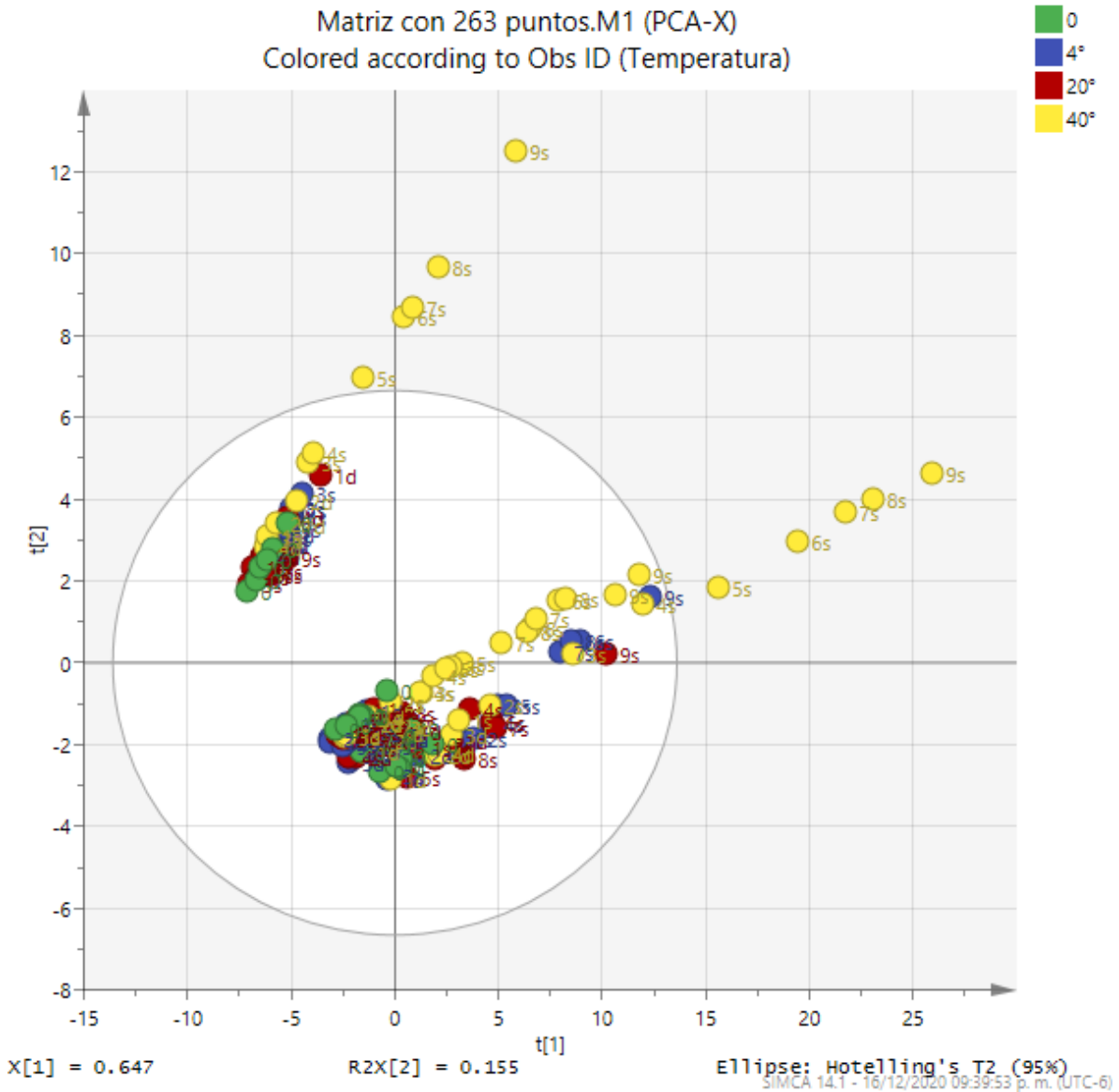


## Resultados y discusión



**Figura 11.** Gráfico de puntuaciones (*score plot*) del modelo PCA, cada punto corresponde a las muestras almacenadas a las distintas condiciones de temperatura (4, 20 y 40 °C) y tiempo (1-3 días y 5-9 semana), los puntos del gráfico están coloreados respecto al tipo de vino y etiquetados conforme a los días de almacenamiento.

## Resultados y discusión



**Figura 12.** Gráfico de puntuaciones (*score plot*) del modelo PCA, cada punto corresponde a las muestras almacenadas a las distintas condiciones de temperatura (4, 20 y 40 °C) y tiempo (1-3 días y 5-9 semana), los puntos del gráfico están coloreados respecto a la temperatura y etiquetados conforme a los tipos de muestra.

## Conclusiones

### 7 Conclusiones

- Los perfiles espectrales de los vinos estudiados mostraron cambios en función de las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura), los cuales fueron mayores cuando las muestras se almacenaron a 40 °C.
- Los cambios observados en las muestras almacenadas en un nivel de llenado al 50% fueron ligeramente mayores en comparación de los que estaban al 100%
- De las condiciones de almacenamiento estudiadas (temperatura, tiempo y nivel de llenado) la temperatura fue la que tuvo mayor impacto en el cambio del perfil espectral de los vinos. Además, al aumentar esta variable los cambios observables a través del tiempo eran mayores.
- Con los estudios quimiométricos actuales se concluye que, el perfil espectral de las muestras almacenadas a 4 y 20 °C es similar al de las muestras analizadas al momento de abrir la botella durante aproximadamente tres semanas, mientras que, el perfil espectral de las muestras almacenadas a 40 °C cambia a los pocos días.

## 8 Referencias

- [1] I. Hornsey, *The Chemistry and Biology of Winemaking*. 2007.
- [2] A. L. Waterhouse, G. L. Sacks, and D. W. Jeffery, *Understanding wine chemistry*. 2016.
- [3] J.-L. de Klerk, "Succinic acid production by wine yeasts," *Notes*, no. March, p. 149, 2010, [Online]. Available: <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/4228>.
- [4] E. J. Bartowsky and P. A. Henschke, "Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-A review," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 125, no. 1, pp. 60–70, 2008, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016.
- [5] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, and D. Dubourdieu, *Handbook of Enology Volume 2 The Chemistry of wine stabilization and treatments 2nd edition*. 2006.
- [6] M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo, *Wine chemistry and biochemistry*. 2009.
- [7] R. S. (PhD) Jackson, *Wine Science principles and applications*, vol. 3, no. 01. 2013.
- [8] C. Li, X. Xu, Z. Tao, X. J. Wang, and Y. Pan, "Resveratrol dimers, nutritional components in grape wine, are selective ROS scavengers and weak Nrf2 activators," *Food Chem.*, vol. 173, pp. 218–223, 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.165.
- [9] E. Choe and D. B. Min, "Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods," *J. Food Sci.*, vol. 70, no. 9, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb08329.x.
- [10] A. L. Waterhouse and V. F. Laurie, "306 – Waterhouse and Laurie Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 57, no. 3, pp. 306–313, 2006, [Online]. Available: <http://www.ajevonline.org/content/57/3/306%5Cnhttp://www.ajevonline.org/content/57/3/306.full.pdf>.
- [11] J. C. Danilewicz, "Chemistry of manganese and interaction with iron and copper in wine," *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 67, no. 4, pp. 377–384, 2016, doi: 10.5344/ajev.2016.16033.

- [12] “Phenolic Compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine.” [Online]. Available: [http://ac.els-cdn.com/S1350417707000144/1-s2.0-S1350417707000144-main.pdf?\\_tid=a5d3f012-d8ec-11e4-b5c1-00000aab0f6b&acdnat=1427947343\\_8f254e01181daed5ab5f321b77f95924](http://ac.els-cdn.com/S1350417707000144/1-s2.0-S1350417707000144-main.pdf?_tid=a5d3f012-d8ec-11e4-b5c1-00000aab0f6b&acdnat=1427947343_8f254e01181daed5ab5f321b77f95924).
- [13] C. M. Oliveira, A. C. S. Ferreira, V. De Freitas, and A. M. S. Silva, “Oxidation mechanisms occurring in wines,” *Food Res. Int.*, vol. 44, no. 5, pp. 1115–1126, 2011, doi: 10.1016/j.foodres.2011.03.050.
- [14] C. E. Butzke, E. E. Vogt, and L. Chacón-Rodríguez, “Effects of heat exposure on wine quality during transport and storage,” *J. Wine Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 15–25, 2012, doi: 10.1080/09571264.2011.646254.
- [15] N. Scrimgeour, S. Nordestgaard, N. D. R. Lloyd, and E. N. Wilkes, “Exploring the effect of elevated storage temperature on wine composition,” *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 21, pp. 713–722, 2015, doi: 10.1111/ajgw.12196.
- [16] P. Arapitsas, G. Speri, A. Angeli, D. Perenzoni, and F. Mattivi, “The influence of storage on the ‘chemical age’ of red wines,” *Metabolomics*, vol. 10, no. 5, pp. 816–832, 2014, doi: 10.1007/s11306-014-0638-x.
- [17] H. Hopfer, P. A. Buffon, S. E. Ebeler, and H. Heymann, “The combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a cabernet sauvignon wine,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 61, no. 13, pp. 3320–3334, 2013, doi: 10.1021/jf3051736.
- [18] D. Cozzolino and R. G. Damberg, *Instrumental analysis of grape, must and wine*. Woodhead Publishing Limited, 2010.
- [19] N. Ogrinc, I. J. Košir, J. E. Spangenberg, and J. Kidrič, “The application of NMR and MS methods for detection of adulteration of wine, fruit juices, and olive oil. A review,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 376, no. 4, pp. 424–430, 2003, doi: 10.1007/s00216-003-1804-6.
- [20] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, and E. H. (Imperial C. London), *Handbook of Metabonomics and Metabolomics*. .

- [21] J. M. Cevallos-Cevallos, J. I. Reyes-De-Corcuera, E. Etxeberria, M. D. Danyluk, and G. E. Rodrick, "Metabolomic analysis in food science: a review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 11–12, pp. 557–566, 2009, doi: 10.1016/j.tifs.2009.07.002.
- [22] A. H. Emwas *et al.*, "Nmr spectroscopy for metabolomics research," *Metabolites*, vol. 9, no. 7, 2019, doi: 10.3390/metabo9070123.
- [23] N. V. Reo, "NMR-based metabolomics," *Drug Chem. Toxicol.*, vol. 25, no. 4, pp. 375–382, 2002, doi: 10.1081/DCT-120014789.
- [24] F. M. Amaral and M. S. B. Caro, "Investigation of different pre-concentration methods for NMR analyses of Brazilian white wine," *Food Chem.*, vol. 93, no. 3, pp. 507–510, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.09.039.
- [25] L. Viggiani and M. A. C. Morelli, "Characterization of wines by nuclear magnetic resonance: A work study on wines from the Basilicata region in Italy," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 18, pp. 8273–8279, 2008, doi: 10.1021/jf801513u.
- [26] I. J. Košir and J. Kidrič, "Identification of amino acids in wines by one-and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 1, pp. 50–56, 2001, doi: 10.1021/jf0008137.
- [27] S. Esslinger, J. Riedl, and C. Faul-Hassek, "Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control," *Food Res. Int.*, vol. 60, pp. 189–204, 2014, doi: 10.1016/j.foodres.2013.10.015.
- [28] Y. B. Monakhova, H. Schäfer, E. Humpfer, M. Spraul, T. Kuballa, and D. W. Lachenmeier, "Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in <sup>1</sup>H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages," *Magn. Reson. Chem.*, vol. 49, no. 11, pp. 734–739, 2011, doi: 10.1002/mrc.2823.
- [29] R. T. McKay, "How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabonomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution," *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.*, vol. 38 A, no. 5, pp. 197–220, 2011, doi: 10.1002/cmr.a.20223.
- [30] M. Guéron, P. Plateau, and M. Decorps, "Solvent signal suppression in NMR," *Prog.*

- Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, vol. 23, no. 2, pp. 135–209, 1991, doi: 10.1016/0079-6565(91)80007-O.
- [31] Y. S. Hong, “NMR-based metabolomics in wine science,” *Magn. Reson. Chem.*, vol. 49, no. SUPPL. 1, 2011, doi: 10.1002/mrc.2832.
- [32] N. Waksman Minsky and A. Saucedo Yáñez, “Breve historia de la Resonancia Magnética Nuclear: desde el descubrimiento hasta la aplicación en imagenología,” *Educ. Química*, vol. 30, no. 2, p. 129, 2019, doi: 10.22201/fq.18708404e.2019.2.68418.
- [33] R. H. Sampieri, *NMR Spectroscopy basic orinciples, concepts and application in chemistry*. .
- [34] J. Keeler, *Undestanding NMR spectroscopy*, vol. 132. 2014.
- [35] R. G. Brereton, *Applied Chemometrics for scientist*. .
- [36] S. Moncayo, S. Manzoor, F. Navarro-Villoslada, and J. O. Caceres, “Evaluation of supervised chemometric methods for sample classification by Laser Induced Breakdown Spectroscopy,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 146, p. 354, 2015, doi: 10.1016/j.chemolab.2015.06.004.
- [37] L. Gougeon, G. da Costa, F. Guyon, and T. Richard, “<sup>1</sup>H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines,” *Food Chem.*, vol. 301, no. July, p. 125257, 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125257.