



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Metabólica basada en Resonancia Magnética
Nuclear de vinos Nebbiolo, Barbera y Cabernet
Sauvignon de la región de Baja California,
México

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Química

PRESENTA

Samantha Martínez Casas

Ciudad Universitaria, CDMX. 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:

VOCAL:

SECRETARIO:

1^{er} SUPLENTE:

2^{do} SUPLENTE:

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear, Instituto de Química,
Ciudad Universitaria, UNAM.

ASESOR DE TEMA

Dra. Nuria Esturau Escofet

ASESOR TÉCNICO

SUSTENTANTE

Samantha Martínez Casas

Agradecimientos.

A la UNAM, por los años de formación.

Al 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" otorgado a la doctora Nuria.

A CONACYT por la beca otorgada.

A la doctora Nuria, a Martha y a Beatriz Quiroz por su conocimiento, tiempo y apoyo.

A mis amigos, por las risas.

A mi familia por su amor y paciencia.

Y a mi papá por la confianza, apoyo y amor toda su vida.

1. ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	HIPÓTESIS.....	3
3.	OBJETIVOS.....	3
3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	3
3.2.	OBJETIVOS PARTICULARES	3
4.	MARCO TEÓRICO.....	4
4.1.	VINO	4
4.1.1.	COMPOSICIÓN QUÍMICA	4
4.1.2.	VINIFICACIÓN	5
4.1.3.	TÉCNICAS COMPENSATIVAS: COUPAGE Y COVINIFICACIÓN	10
4.1.4.	VARIEDADES DE UVAS.	10
4.1.5.	VARIEDADES DE UVAS TINTAS.....	11
4.2.	PRODUCCIÓN DE VINO EN MÉXICO.....	12
4.2.1.	BAJA CALIFORNIA NORTE	13
4.3.	IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DEL VINO	14
4.4.	CIENCIAS ÓMICAS.....	15
4.4.1.	METABOLÓMICA	16
4.5.	PLATAFORMAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA	16
4.5.1.	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	17
4.6.	METABOLÓMICA BASADA EN RMN PARA EL ANÁLISIS DEL VINO.....	21
4.7.	PERFIL METABÓLICO DEL VINO POR RMN	22
4.7.1.	VARIEDAD DE UVA.....	22
4.7.2.	PROCESO DE FERMENTACIÓN Y REFINAMIENTO.....	24
4.8.	HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL PERFIL METABÓLICO	26
4.8.1.	ANÁLISIS UNIVARIADO	26
4.8.2.	ANÁLISIS MULTIVARIADO: QUIMIOMETRÍA.	26
5.	METODOLOGÍA.....	29
5.1.	PRUEBAS DE DESEMPEÑO DEL EQUIPO.....	29
5.1.1.	CALIBRACIÓN DE TEMPERATURA	29
5.1.2.	CALIBRACIÓN DE PRESATURACIÓN	30
5.2.	MUESTRAS DE VINO	30
5.3.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	30

5.4.	PARÁMETROS DE ADQUISICIÓN DE EXPERIMENTOS DE RMN.....	31
5.5.	PROCESAMIENTO	31
5.6.	PRE-PROCESAMIENTO	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1.	ESPECTROS DE RMN DE VINOS.....	34
6.2.	IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS.....	35
6.3.	ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO.....	37
6.3.1.	ESTUDIO DE LA VARIEDAD DE UVA.....	37
6.3.2.	ESTUDIO DEL PROCESO DE COVINIFICACIÓN Y DEL MEZCLADO DE VINOS.....	48
7.	CONCLUSIONES	55
8.	ANEXO.....	56
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	59

TABLA DE SIGLAS Y SÍMBOLOS.

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
¹H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón unidimensional
pH	Potencial de Hidrógeno
μL	Microlitro
FID	Decaimiento por inducción libre
MHz	Mega Hertz
D₂O	Óxido de deuterio
TSP	Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico
MeOD-d₄	Metanol deuterado
mM	Milimolar
DSS	Sal sódica del ácido trimetilsililpropanosulfónico
H₂O	Agua
KH₂PO₄	Fosfato monopotásico
PCA	Análisis de componentes principales
PC	Componente principal
OPLS-DA	Análisis discriminante ortogonal por mínimos cuadrados parciales

1. INTRODUCCIÓN

La presente tesis tiene como finalidad realizar el estudio de muestras de vino de Baja California Norte, México, para conocer a partir de los datos espectrales su composición, las similitudes y/o diferencias en sus perfiles metabolómicos y la posible asociación con características específicas de las muestras. La técnica que se utilizará es la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) junto con técnicas estadísticas multivariadas. El 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” que entre sus objetivos está el crear una base de datos de Huellas dactilares de RMN para vinos de México.

El acrónimo OMICS en el título del proyecto deriva de las ciencias “ómicas”, que son un conjunto de disciplinas que permiten estudiar un gran número de moléculas involucradas en la función de un organismo, como son los genes, las proteínas y los metabolitos, dando origen a la genómica, la proteómica y la metabolómica, entre otras. La metabolómica es la ómica más reciente y se basa en el estudio de moléculas (metabolitos) de bajo peso molecular.

A través del análisis multivariado de los datos espectrales, la metabolómica permite clasificar muestras en función de muchas variables e identificar biomarcadores. En la industria vitivinícola, permite la identificación de compuestos y los vincula a factores relacionados al tipo de vino, su origen, su añada, etc., lo que es de gran importancia para la autenticación del producto y que impacta directamente en el ámbito económico de un país.

Los objetivos planteados para este trabajo fueron: i) el análisis de vinos de tres variedades (Cabernet Sauvignon, Nebbiolo y Barbera) de la región de Baja California Norte y ii) el estudio de la diferencia entre una covingación y el mezclado de dos variedades (Barbera y Nebbiolo) para la producción de un vino. En ambos casos el análisis se realizó directamente en los datos espectrales,

utilizando métodos de análisis multivariado para conocer diferencias significativas entre los diferentes vinos.

La presente investigación ha permitido conocer cuáles son los metabolitos responsables de la diferenciación entre variedades de vino y los diferentes procesos.

2. HIPÓTESIS

Mediante el análisis quimiométrico de los datos espectrales de RMN de las muestras de vino, se observarán las diferencias entre ellos, dependiendo de sus características particulares como: la variedad de uva o proceso de vinificación.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis de vinos procedentes de distintas regiones vitivinícolas de Baja California Norte y establecer las diferencias entre variedades y procesos utilizando un enfoque metabolómico basado en RMN.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aplicar la metodología pertinente para el análisis de las muestras y obtener los espectros ^1H -RMN de vinos provenientes de Baja California Norte para la identificación de los metabolitos presentes.
- Seleccionar el tipo de escalado que mejor ajuste a los datos espectrales y realizar los análisis quimiométricos mediante el software SIMCA para encontrar patrones de agrupación.
- Señalar los metabolitos que hacen diferencias significativas entre los vinos monovarietales y los metabolitos que hacen diferencias significativas entre los procesos para obtener un vino de dos variedades.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. VINO

El vino es una solución hidroalcohólica medianamente ácida ($3 < \text{pH} < 4$)¹, producto de la fermentación del jugo de uva.

4.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El vino está constituido por varios cientos de componentes con diferentes concentraciones. Los compuestos mayoritarios son agua, etanol, glicerol, ácidos orgánicos, azúcares y diferentes iones.² En la Tabla 1 se enlistan los grupos de compuestos de diferente naturaleza química. Además de definir la calidad y el carácter del vino, la composición química refleja la historia del proceso de fabricación, incluyendo la variedad de uva, de levadura, el proceso de fermentación, el almacenaje, así como el origen geográfico,³ al conjunto de estas características se denomina como *terroir*.⁴

Los ácidos orgánicos hacen la mayor contribución a la composición, estabilidad y propiedades organolépticas, especialmente en vinos blancos. Sus propiedades preservativas también mejoran la estabilidad microbiológica y fisicoquímica. Además del agua, el etanol es el compuesto más abundante en el vino y es principalmente producido en la fermentación alcohólica. Otro de los alcoholes presente en mucha menor cantidad es el metanol, cuya producción depende del contenido de pectinas de la uva. Los alcoholes superiores también son producto de la fermentación tanto de azúcares como de aminoácidos y éstos, junto con sus ésteres tienen intensos olores que contribuyen en el aroma del vino. Los azúcares o carbohidratos son moléculas polifuncionales, capaces de participar en un gran número de reacciones químicas, bioquímicas y metabólicas. Los aminoácidos contribuyen a la capacidad de amortiguamiento del mosto y vino, estas sustancias son muy útiles debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, surfactantes y emulsificantes. Los minerales surgen de varias fuentes, pueden

provenir del suelo donde creció la uva o del proceso de vinificación. El potasio, proveniente de sus sales, es el ion más abundante que se encuentra disuelto en el vino. Los compuestos que contribuyen en el aroma son moléculas volátiles, y, el olor asociado a ellos puede clasificarse en función de cuando se forman (uva, proceso de fermentación o almacenamiento).⁵

*Tabla 1. Clases de compuestos generales del vino.*⁵

Clase	Compuestos
Ácidos orgánicos	Ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido 2-ceto-D-glucónico, ácido mícico, ácido cumárico, ácido caféico, ácido coutárico.
Alcoholes y compuestos volátiles	Etanol, metanol, alcohol isopropílico, alcohol isobutílico, alcohol isoamílico, fenoles, 2,3-butanodiol, manitol, inositol, ácido fórmico, ácido acético.
Carbohidratos	Glucosa, fructosa, arabinosa, ramnosa, xilosa.
Minerales	Potasio, hierro, cobre, zinc, plomo, manganeso, aluminio.
Aminoácidos	Prolina, valina, alanina, arginina, glutamato.
Aroma varietal	Terpenos, terpenoles, mercaptanos.

4.1.2. VINIFICACIÓN

Los pasos requeridos en la transformación de la uva en vino (vinificación), empiezan con la selección y cosecha de la uva, proceso que puede hacerse manual o mecánicamente. La composición química de la uva está dada principalmente por agua, seguida por azúcares (glucosa, fructosa) y ácidos orgánicos (tartárico, málico, cítrico). Otros compuestos importantes son los aminoácidos (prolina arginina, alanina, ácido aspartico y ácido glutámico),⁶ proteínas y compuestos fenólicos (ácido caféico, coumárico, gálico, syringico, resveratrol, catequina, epicatequina).⁷

Posteriormente, se realiza el despallado, que es el proceso de separar los tallos de las uvas. Dependiendo del procedimiento de vinificación, esto se puede hacer antes del estrujamiento las uvas para obtener el mosto. Para la producción de vinos tintos y rosados, se permite el contacto del jugo con las pieles para la

Está bien establecido que el agente más importante en la fermentación alcohólica es *S. cerevisiae*, la levadura que es ampliamente utilizada en diferentes industrias (vino, cerveza, cidra y pan) como iniciador microbiano. Esta especie se convierte en el principal agente para la industria durante la fermentación alcohólica de frutas y jugos de frutas debido al ambiente altamente selectivo (pH bajo, altas concentraciones de azúcares y etanol y condiciones anaeróbicas).⁹

Posteriormente, se realiza la fermentación maloláctica, un proceso que se realiza para disminuir la acidez de los vinos, gracias a bacterias lácticas como *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Lactobacterium* y *Leuconostoc*. Las bacterias lácticas realizan una descarboxilación enzimática del ácido dicarboxílico L-málico al ácido monocarboxílico L-láctico en una reacción que requiere NAD^+ y Mn^{2+} , como se representa en la Figura 2.¹⁰ Este proceso generalmente se realiza en barriles.

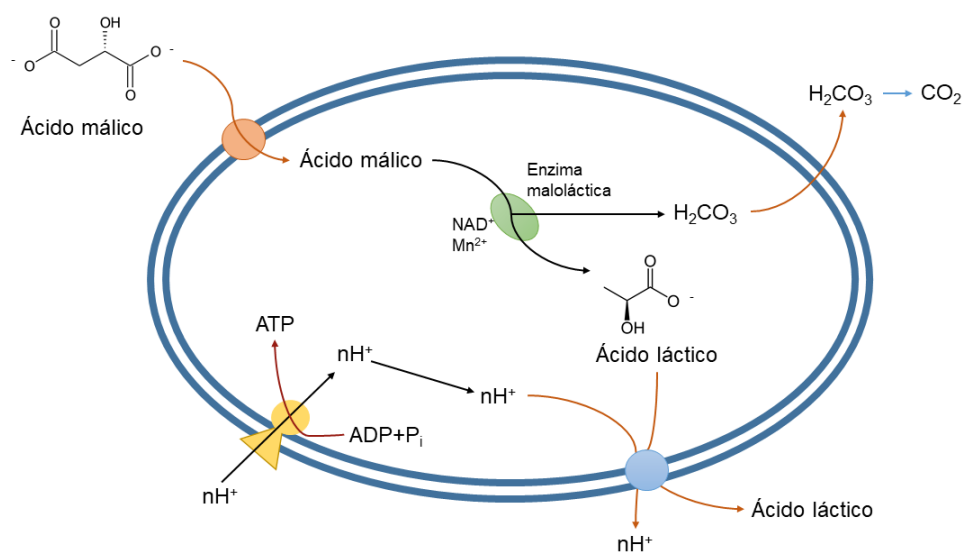


Figura 2. Proceso de fermentación maloláctica dentro de bacteria láctica.

Después de la fermentación maloláctica, otro proceso de degradación se lleva a cabo; la acidez volátil incrementa debido al metabolismo del ácido cítrico del cuál son obtenidos CO_2 , 2,3-butanodiol, acetoína, ácido acético, etanol y ácido D- y L-láctico (Figura 3).

Las etapas de esta degradación del ácido cítrico son:

- Transformación en ácido oxaloacético y ácido acético bajo la influencia de la citrato liasa;
- Transformación del ácido oxaloacético en ácido pirúvico y CO_2 bajo la influencia de la oxalato-decarboxilasa;
- Transformación del ácido pirúvico en ácido láctico, acetoína, 2,3-butanodiol y ácido acético.

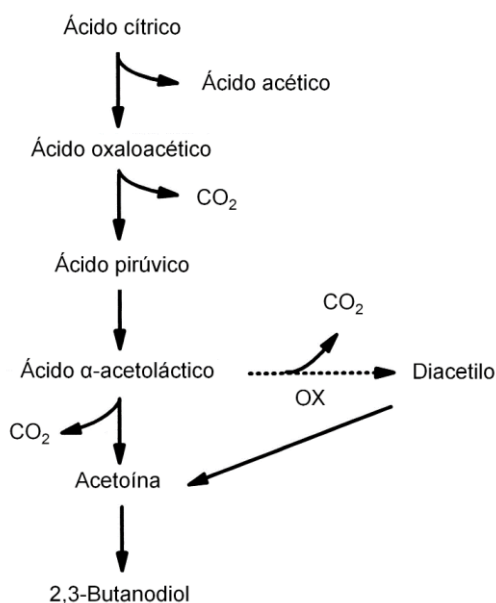


Figura 3. Diagrama de proceso de degradación del ácido cítrico.

Posteriormente, el vino se clarifica y estabiliza. En la clarificación, se remueve el material insoluble y suspendido, esto incluye tartratos, pectinas, algunas proteínas y un pequeño número de células microbianas.¹¹

Finalmente, antes del embotellado del vino, el vino se madura o envejece; en un proceso de dos etapas: una oxidativa donde es almacenado en barricas de madera, toneles de roble o recipientes de otro material dotados con dosificadores de oxígeno o micro-porosidades. Durante esta etapa, se realiza la operación de trasiego, que consiste en trasvasar el vino de unas barricas a otras para eliminar los depósitos formados en el fondo del barril. En la maduración del vino, éste se almacena en barricas de madera, lo que modifica la composición del vino y sus

propiedades organolépticas, pues fenoles simples volátiles o no volátiles, flavonoides y taninos hidrolizables pueden ser extraídos progresivamente de la madera.¹² La siguiente etapa es la fase reductora o de botella, donde el vino es embotellado, en esta etapa se da la reacción entre los propios componentes del vino sin la presencia del oxígeno, lo que hace que ciertos sabores y aromas se potencien y afinen. En la Figura 4, se muestra un resumen gráfico del proceso de vinificación de un vino monovarietal.

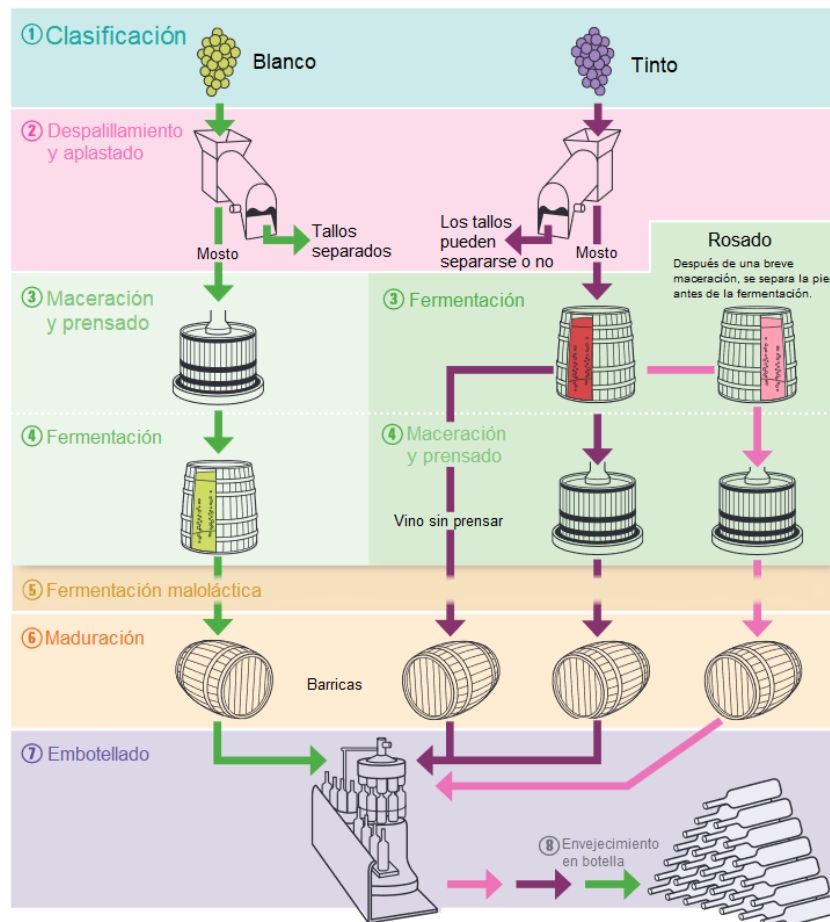


Figura 4. Proceso general de vinificación.¹³

4.1.3. TÉCNICAS COMPENSATIVAS: COUPAGE Y COVINIFICACIÓN

Generalmente, para obtener un vino con un perfil organoléptico más complejo y balanceado, se recurre a técnicas compensativas, en las cuales se mezclan dos o más variedades de uva para la producción de un vino multivarietal. Estas son:

- *Coupage*: Es la mezcla de dos vinos terminados.
- *Covinificación*: Esta técnica implica la maceración simultánea de diferentes variedades de uva y su fermentación.
- *Co-fermentación*: En esta técnica se utilizan dos cepas de levadura para inocular el mosto.

El *coupage* es la práctica más común en el mercado pues es una forma rápida y efectiva de obtener una mejora en la composición del vino. La *covinificación* presenta algunos problemas como la diferencia de madurez de las uvas, pero este problema puede resolverse refrigerando las uvas o llevando a cabo la *covinificación* en lugares donde las variedades tengan etapas de madurez similares.¹⁴

4.1.4. VARIEDADES DE UVAS.

El género *Vitis* (80 especies identificadas) está compuesto de dos subgéneros: *muscadinia* y *euvitis*. El subgénero *muscadinia* incluye la especie *M. rotundifolia*, que crece en el sureste de Norteamérica y se caracteriza por su resistencia a la mayoría de enfermedades criptogámicas a la que son susceptibles muchas variedades de *Vitis vinífera*. Gran parte de la vid cultivada pertenece al subgénero *euvitis* y en este caen tres grupos:

- Grupo americano; conformado por más de 20 especies, incluyendo *V. berlandieri*, *V. riparia* y *V. rupestris*, que fueron usadas para modificar otras variedades frente a la crisis de *phyloxera*.

- Grupo del este de Asia; consiste alrededor de 50 especies, las cuales están consideradas de importancia limitada para la viticultura.
- Grupo euroasiático; compuesto por una sola especie, *Vitis vinífera* L. Hay dos subespecies de *Vitis vinífera*: *sylvestris*, que corresponde a la forma silvestre de la vid y *vinífera*, que es la forma cultivada.

Durante años, el cultivo de la vid ha llevado a un aumento significativo en la diversidad génica, tanto por la reproducción sexual como la hibridación. Con tantos miles de variedades, el género *Vitis* está caracterizado por altos niveles de diversidad genética. El catálogo internacional de variedades de *Vitis* (VIVC) incluye 12,250 nombres de variedades para *V. vinífera*. El número actual de variedades de uva en el mundo se estima alrededor de 6000.¹⁵ Algunas de estas son:

Chardonnay Blanc, Pinot Noir, Riesling Weiss, Pinot Gris, Sauvignon Blanc, Muscat à Petit Grains Blancs, Cabernet Sauvignon, Merlot Noir, Müller-Thurgau, Pinot Blanc, Silvaner Grün, Traminer Rot, Cabernet Franc, Chasselas Blanc, Muscat Ottonel, Syrah, Portugieser Blau, Muscat Hamburg, Furmint, Gamay Noir, Kerner, Pinot Meunier, Regent, Welschriesling y Zweigeltrebe Blau.

4.1.5. VARIEDADES DE UVAS TINTAS.

Algunas variedades uva tinta son: Merlot, Zinfandel, Tempranillo, Grenache, Malbec, Syrah, Petit syrah, Barbera, Nebbiolo y Cabernet Sauvignon.

4.1.5.1. BARBERA

La Barbera es una variedad de uva de vino italiana. En el año 2000 era la tercera uva tinta más plantada en Italia (después de la Sangiovese y la Montepulciano). Produce buenos rendimientos y es conocida por su color intenso, sus pocos taninos y sus altos niveles de acidez.

4.1.5.2. NEBBIOLO

Esta variedad es autóctona de la región de Piemonte, donde es utilizada para crear dos excelentes vinos principalmente: el Barolo y el Barbaresco. Ambos son tipos de vinos y denominaciones de origen al mismo tiempo, los cuales pueden ser considerados como los mejores vinos de toda Italia.

4.1.5.3. CABERNET SAUVIGNON

La Cabernet Sauvignon es una de las uvas tintas más conocidas del mundo. Crece en casi todas las grandes zonas vitícolas, en un diverso espectro de climas, desde el valle del Okanagan (Canadá) al valle de la Becá (Líbano). Esta uva se hizo famosa por su presencia en el vino de Burdeos, donde es mezclada a menudo con la Merlot y con la Cabernet Franc. Desde Francia, la uva se ha extendido por Europa y por el Nuevo Mundo instalándose en las montañas Santa Cruz de California, el valle de Napa, la bahía Hawkes de Nueva Zelanda, el río Margaret y la región de Coonawarra de Australia, y los valles chilenos del Maipo y de Colchagua. Durante buena parte del siglo XX, fue la uva tinta de vino premium más plantada del mundo, hasta que fue adelantada por la merlot en los años 90.

4.2. PRODUCCIÓN DE VINO EN MÉXICO

En el reporte del 2019 de la OIV, México cuenta con 37 mil hectáreas de viñedos, se encuentra dentro de los mayores productores de uva de mesa y de uva seca con 0.4 millones de toneladas y 18 mil toneladas, respectivamente. Además, en el año 2018 se consumieron 1.2 millones de hectolitros, colocándolo como uno de los países con incremento en el consumo desde 2014 (Figura 5).¹⁶

Aumento en consumo desde 2014

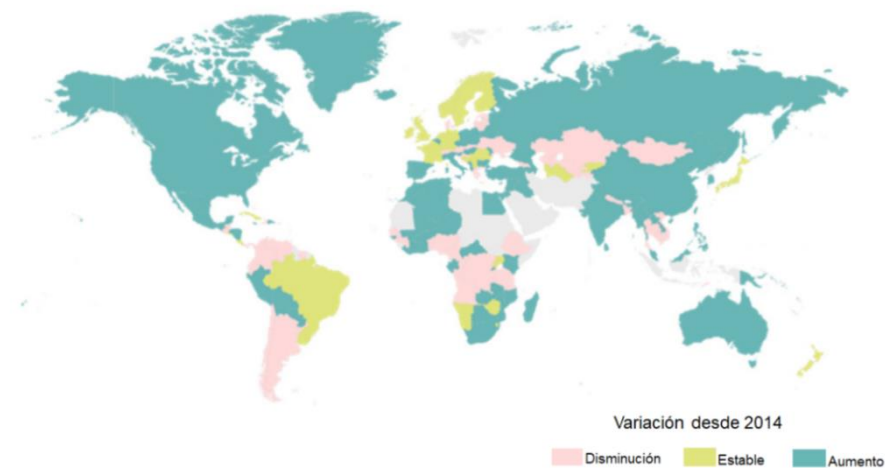


Figura 5. Consumo de vino en el mundo desde 2014.¹⁶

La producción de vinos mexicanos y cultivo de viñas en grandes extensiones de tierra se realiza dentro de los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Sonora, Zacatecas y Baja California Norte. Esta última se considera como una zona privilegiada por estar situada en la franja norte del vino y sus características climáticas, convierten a Baja California Norte en la capital mexicana del vino.¹⁷

4.2.1. BAJA CALIFORNIA NORTE

Está ubicado en el extremo noroeste de la región noroeste del país, limitando al norte con el estado estadounidense de California, al este con Sonora y el mar de Cortés o golfo de California, al sur con Baja California Sur y al oeste con el océano Pacífico. Con 71 450 km² es el doceavo estado más extenso y cuenta con 44,1 habitantes por km².

El estado alberga más de 3 mil 500 hectáreas dedicadas al cultivo de la vid y 170 casas vinícolas que producen 75% del vino mexicano. Es la zona que va desde Mexicali hasta Ensenada y cuenta con influencia del océano Pacífico desde el Este y desde el Oeste. Los principales valles son: Valle de Guadalupe, Calafia, Santo Tomás, San Vicente y San Antonio de las Minas (Figura 6).

Las variedades de vid que se cultivan principalmente son:

Tintas: Cabernet Sauvignon y Merlot. Blancas: Chardonnay, Chenin Blanc y Sauvignon Blanc.¹⁷

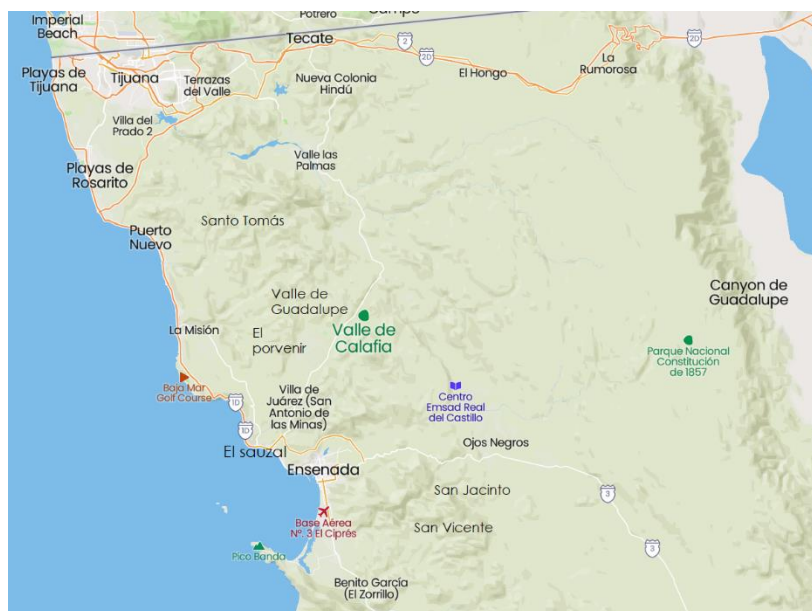


Figura 6. Mapa de región vinícola de Baja California Norte.

4.3. IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DEL VINO

Un atributo importante para la vinificación, la marca y la comercialización, es el monitoreo y control de calidad de los vinos a través del análisis cuantitativo. El análisis de rutina ofrece varios beneficios, incluida la confirmación de la madurez de las uvas cosechadas, el monitoreo de la microflora y la obtención de los datos apropiados para tomar decisiones sobre la alteración de la química del vino (adiciones de ácidos, azúcares o taninos).¹⁸

A lo largo de la historia, se han aplicado diferentes enfoques para el estudio de los alimentos fermentados. Para el vino, la OIV cuenta con un listado de métodos físicos como turbidez, características cromáticas, determinación isotópica de agua en vinos y mosto, entre otras. Y también análisis químico, en los cuales se busca caracterizar el contenido de azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, gases y otros compuestos que forman parte de la matriz.¹⁹ A pesar de toda la información que

se puede obtener de estas pruebas, la información conjunta para la determinación de las características únicas de un vino para garantizar su seguridad, calidad, homogeneidad y evitar fraudes, es un tema crítico, ya que puede tener repercusiones en el sector de salud y economía.

4.4. CIENCIAS ÓMICAS

Las ciencias ómicas están dirigidas principalmente a la detección, caracterización y estudio general de genes (genómica), mRNA (transcriptómica), proteínas (proteómica) y metabolitos (metabolómica), en la Figura 7 se muestra el flujo bidireccional de la información biológica que estudian las ciencias ómicas.

Su uso en el análisis de muestras biológicas permite la obtención de un perfil químico completo de una manera no dirigida y no sesgada.²⁰ Dado este escenario, el uso de las plataformas ómicas permite aminorar la complejidad de la información obtenida de matrices como los alimentos y bebidas fermentadas, permitiendo establecer el rol de los microorganismos y su potencial metabólico, qué genes están expresados, las rutas metabólicas que están activas o inactivas y cuáles son los productos finales, al mismo tiempo que se observa el efecto de condiciones variables durante todo el proceso de elaboración (pH, concentración de sales, temperatura, etc.).²¹

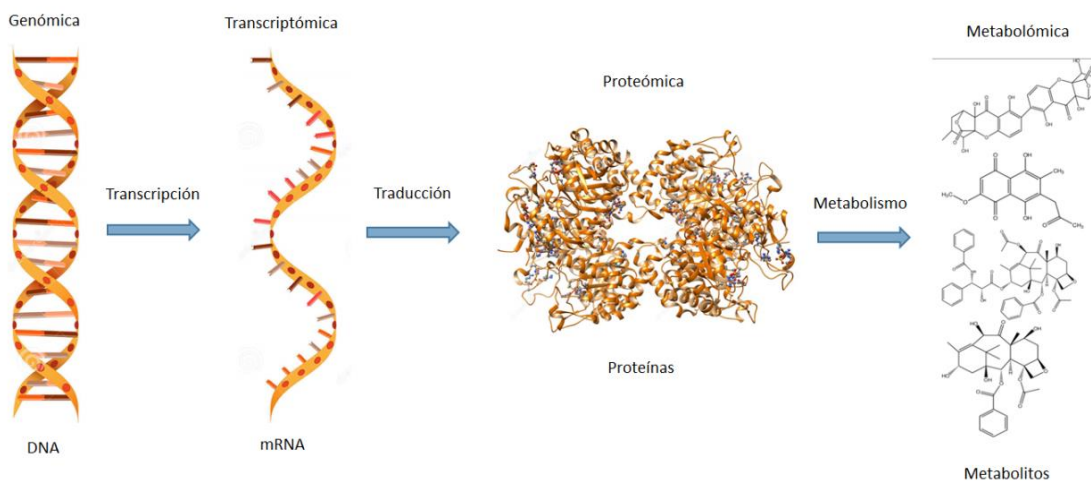


Figura 7. Descripción de las ciencias ómicas.

Estas ciencias ahora se aplican ampliamente a todas las disciplinas biológicas. En ciencias de la alimentación, hay dos líneas principales de investigación:

- I) Foodomics, que estudia cómo los alimentos influyen en la salud y en el desarrollo o prevención de enfermedades y II) entender los fenómenos de fermentación y transformación en los alimentos.

4.4.1. METABOLÓMICA

La metabolómica se encarga del análisis y estudio integral de pequeñas moléculas (<1500 Da), llamados metabolitos.²² El análisis de los metabolitos pretende la colección de un perfil del fenotipo analizado en una muestra y, desde que los metabolitos son considerados como el producto final de la interacción del genoma y el ambiente, el estudio de productos alimenticios es un campo ideal para esta plataforma.

La metabolómica se ha desarrollado rápidamente gracias a diversas técnicas o plataformas analíticas y tiene particular relevancia en la autenticación de productos alimenticios gracias a biomarcadores, así como relacionar las cualidades nutricionales y sensoriales y seleccionar compuestos relacionados al sabor.

Generalmente se utilizan dos enfoques en los estudios metabolómicos: no dirigidos y dirigidos. En el primero, el perfil metabólico es evaluado sin conocimiento previo de qué metabolito es responsable de la respuesta en el sistema. En el segundo, un grupo específico de metabolitos son identificados y cuantificados bajo ciertas condiciones para el estudio de alguna propiedad como el poder antioxidante o el origen geográfico.

4.5. PLATAFORMAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA

Las plataformas analíticas más utilizadas para el estudio metabolómico del vino son la espectroscopia de RMN y la espectrometría de masas (EM) acoplada a métodos de separación como cromatografía de gases y cromatografía de líquidos,

ambos presentan pros y contras, listados en la Tabla 2. También se emplean (de forma menos frecuente) la electroforesis capilar y la espectrometría de masas de ultra alta resolución vía transformada de Fourier ion ciclotrón (FT-ICR-MS).²³ Cada una presenta características propias que las han hecho adecuadas para un grupo de metabolitos. En este sentido cada técnica analítica caracteriza una parte distinta del metaboloma y es capaz de ver un grupo distinto de metabolitos según las propiedades físicoquímicas de los mismos y el límite de sensibilidad de la técnica.

Tabla 2. Fortalezas y debilidades de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas acoplada para la metabolómica.²⁴

Técnica	Fortalezas	Debilidades
RMN	Detección de todos los metabolitos en una matriz. Fácil y mínima preparación de muestra. No destructiva. Muy alta reproducibilidad. Cuantificación robusta.	Bajos límites de detección (micromolar). Uso de grandes volúmenes de muestra.
LC-ESI MS	Muy sensible. Uso de bajos volúmenes de muestra (nL a µL).	Generalmente pobre separación cromatográfica. Supresión iónica o falta de ionización de ciertos tipos de metabolitos. Extracción obligada de metabolitos en un disolvente adecuado. Destructiva.
GC-EI MS	Muy sensible. Buena separación cromatográfica.	Adecuada solamente para compuestos volátiles y estables térmicamente. La preparación de muestra típicamente requiere derivatización química. Destructiva.

4.5.1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La espectroscopia de RMN es una de las principales técnicas analíticas para estudios metabolómicos en general, así como para estudios de “foodomics”²⁵. Se basa en un fenómeno de absorción y emisión de energía en el rango de

radiofrecuencia del espectro electromagnético por ciertos núcleos atómicos cuando se colocan dentro de un campo magnético.

El principio de la técnica es el siguiente: los núcleos de los átomos, que presentan propiedades magnéticas precesan a la frecuencia de Larmor (ν_L), que es proporcional a la densidad de flujo magnético del campo magnético B_0 , y son distribuidos en varios niveles de energía definidos por la orientación de sus momentos magnéticos siguiendo una distribución de Boltzmann. Los núcleos se encuentran mayoritariamente en el nivel de energía más bajo, y, como consecuencia en el eje z se produce una magnetización macroscópica M_0 a lo largo de la dirección del campo (Figura 8).

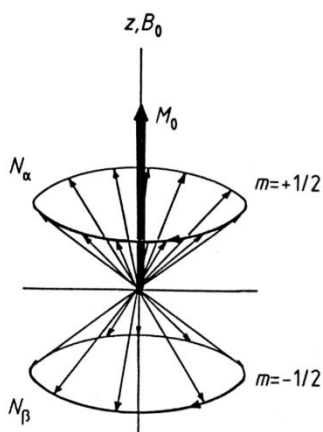


Figura 8. Distribución de dipolos nucleares y magnetización macroscópica.²⁶

Después de que alcanzan el equilibrio térmico, los núcleos son irradiados por un pulso de radiofrecuencia a lo largo de la dirección del eje x, que produce un campo magnético dependiente del tiempo B_1 . Si el tiempo de excitación es suficientemente corto, la magnetización transversal al final del pulso de RF es coherente y, posteriormente, en el instante en el que el pulso es apagado, el vector de magnetización M_0 precesa a su posición de equilibrio sobre el campo principal a través de un ángulo Θ , en RMN, los ángulos de pulso más usados son de 90° y 180° .

La señal detectada por el equipo después de un pulso, es determinada por la componente en el eje y, produciendo una curva de decaimiento de la

magnetización transversal, conocida como decaimiento por inducción libre (Figura 9) o FID (por sus siglas en inglés).

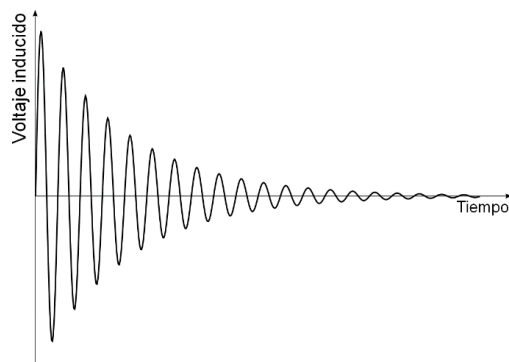


Figura 9. Decaimiento por inducción libre.

Para un experimento normal de RMN, múltiples FIDs son adquiridas ya que el conjunto de estas contienen las frecuencias de resonancia y una intensidad con una buena relación señal/ruido, el resultado es un interferograma. Para la interpretación de este, es necesario transformarlo al dominio de frecuencia, por lo que el equipo realiza una operación matemática conocida como Transformada de Fourier (TF), esta resuelve una señal de FID compleja en las frecuencias individuales que se sumaron para generarla.

Como resultado, se obtiene un espectro de RMN que da información de la estructura molecular de los componentes de la matriz reflejada como: el desplazamiento químico y el acoplamiento spin-spin.

Desplazamiento químico: Surge de la resistencia de la nube electrónica de una molécula al campo magnético aplicado. Los núcleos son afectados igualmente y la respuesta es un efecto de apantallamiento, protegiendo al núcleo de sentir el efecto total del campo, por lo que es un campo efectivo B_{eff} , el que interacciona con los núcleos. Ya que no todos los núcleos en una molécula son equivalentes, están protegidos de diferente manera, por lo que producen señales de resonancia separadas en un espectro.²⁷

De acuerdo a la convención internacional, las señales de resonancia son registradas de derecha a izquierda, conforme la protección de los núcleos disminuye, como se observa en la Figura 10, donde el cero es la señal del TMS.

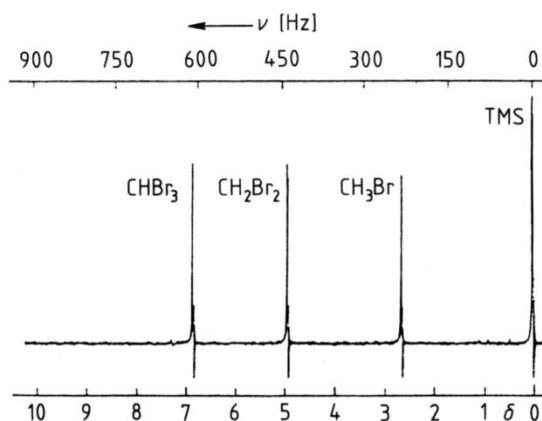


Figura 10. Espectro ^1H -RMN de una mezcla de TMS, CH_3Br , CH_2Br_2 y CHBr_3 .²⁶

Acoplamiento spin-spin: El acoplamiento surge porque el campo magnético de los protones vecinales (adyacentes) influye en el campo que experimenta el protón.

El tamaño de la división (constante de acoplamiento o J) es independiente del campo magnético y, por lo tanto, se mide como una frecuencia absoluta (generalmente Hertz). El número de divisiones indica el número de núcleos unidos químicamente en la vecindad del núcleo observado.

Hay dos tipos de aproximación: de primer orden (Figura 11a) en la que se caracterizan por desplazamientos químicos ampliamente separados o de orden superior (Figura 11b) en la que los desplazamientos químicos son cercanos y se producen distorsiones en la altura del pico.

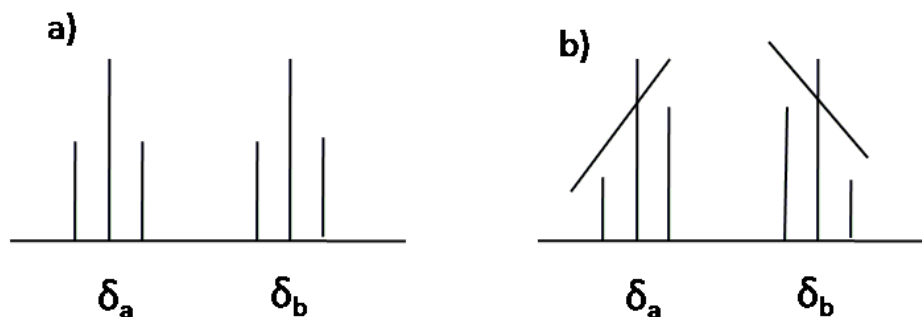


Figura 11. a) Patrón de desdoblamiento de señales en un sistema de primer orden; b) Patrón de desdoblamiento de señales en un sistema de orden superior.

4.6. METABOLÓMICA BASADA EN RMN PARA EL ANÁLISIS DEL VINO

En las últimas décadas, la RMN se ha convertido en una de las plataformas analíticas más utilizadas en metabolómica, ya que la mínima preparación de muestra, el costo reducido por muestra, la rapidez y la habilidad de seguir los cambios en el metaboloma desde las primeras etapas de la producción del vino justifican el amplio uso de esta técnica.

Algunas características atractivas de la espectroscopia de RMN incluyen la identificación simultánea y la cuantificación absoluta de compuestos, el potencial de predicción de parámetros de autenticación tal como variedad de uva, la verificación del origen geográfico por país y regiones, el monitoreo de la fermentación, el añejamiento y envejecimiento, así como la posible detección de fraudes o infecciones.²⁸

Debido a que casi no se requiere pretratamiento de la muestra, las propiedades esenciales de la matriz se mantienen durante el análisis. Los compuestos mayoritarios que se detectan con esta técnica son agua y etanol, pero estas señales se eliminan con dos experimentos que contienen secuencias de pulsos para la supresión del disolvente (agua) y de las señales del etanol²⁹. Esto permite la identificación de compuestos minoritarios como ácidos orgánicos, aminoácidos, carbohidratos y polifenoles. Posterior a la adquisición espectroscópica de una huella dactilar específica para cada muestra individual, estos perfiles son

comparados con bases de datos para la identificación de los metabolitos para después usar enfoques estadísticos multivariados³⁰ como PCA (por sus siglas en inglés, Principal Component Analysis), PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis) y OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis), estos métodos en conjunto, han llevado a la diferenciación de vinos por variedad de uva, origen geográfico o añada.^{31,32,33}

4.7. PERFIL METABÓLICO DEL VINO POR RMN

El estudio metabolómico por RMN aplicado a la enología tiene sus comienzos en 1999³⁴. Desde entonces se ha extendido su uso pues permite la perfilación de la composición metabólica con diversos temas de estudio como: la variedad de uva, su origen geográfico, el añejamiento y el proceso de fermentación.

4.7.1. VARIEDAD DE UVA

La variedad de uva es el factor más básico e importante para elaborar un vino de buena calidad ya que es un parámetro representativo para explicar las características del vino pues su composición química es afectada por factores genéticos.³⁵

Algunos metabolitos pueden ser biomarcadores de la variedad de uva y pueden contribuir a la calidad del vino y a sus propiedades sensoriales³⁶ por lo que es importante diferenciar las variedades y determinar sus diferencias metabólicas en los vinos.

La metabolómica basada en RMN se ha utilizado para clasificar muestras de vino según el tipo de uva utilizada, sea blanca^{37,38} o tinta^{39,40} y con ello, diferenciar diferentes variedades de uva procedentes de una región^{41,42} o país⁴³, una misma variedad de uva en diferentes regiones⁴⁴ o diferentes variedades de diversas regiones⁴⁵. En la Tabla 3, se enlistan algunos de los estudios por variedad de uva y su relevancia.

Tabla 3. Estudios por RMN aplicados al estudio y diferenciación varietal de vinos.

Año	Aplicación	Ref.
2008	Se diferenciaron 3 variedades de vid provenientes de 4 países (Capmbell Early, Corea; Cabernet Sauvignon de Francia, Australia y California (EUA) y Shiraz, Australia). Los metabolitos que contribuyeron a la separación son: prolina, ácido tartárico, ácido gálico, glucosa, 2,3-butanodiol, glicerol, ácido succínico.	35
2009	Se determinaron los perfiles metabólicos (108 y 51 metabolitos identificados) de 5 variedades blancas (Chardonnay, Pinot gris, Riesling, Sauvignon blanc y Viognier) por dos plataformas (cromatografía de gases acoplada a masas y RMN) y las diferencias en la composición de las variedades se correlacionaron a un estudio sensorial. Las diferencias fueron dadas por: aminoácidos, ácidos grasos y orgánicos y azúcares.	37
2009	Se estudiaron 4 variedades de uva (Muscat, Campbell Early, Kyoho y Meoru) de dos regiones de Corea del Sur. Los metabolitos que hacen la diferencia son: 2.3-butanodiol, malato, citrato, glicerol, prolina, trigonelina, succinato, lactato, alanina, GABA, valina, entre otros.	41
2010	Se analizaron 2 variedades de uva (Cabernet Sauvignon y Shiraz) provenientes de Australia, expuestas a diferentes niveles de radiación solar y se correlacionó con un análisis sensorial. Las diferencias entre variedades fueron dadas por: 2,3-butanodiol, ácido tartárico, glucosa, prolina y succinato.	36
2011	Se examinaron los perfiles metabólicos de las variedades blancas Riesling y Mueller-Thurgau de la región alemana de Palatinado, así como la correlación con un análisis sensorial y el efecto del envejecimiento. Los metabolitos responsables por las diferencias varietales fueron: prolina, 2,3-butanodiol, malato, catequina y quercetina.	38
2016	Se analizaron muestras de 5 variedades de vinos tintos (Cabernet Sauvignon, Merlot, Feteasca Neagra, Pinot Noir y Mamaia) provenientes de Rumania de distintos años. Las diferencias por variedad analizadas por RMN radicarón en: los aminoácidos, alcoholes, azúcares y glicerol.	39
2017	Se estudiaron muestras de vino Barbera producidas en tres áreas de Piedmont, además del efecto de la añada y factores climáticos. Se identificaron 65 metabolitos.	44
2018	Se produjeron vinos de variedades de uva Cabernet Sauvignon y Shiraz, de la provincia de Shanxi, China. Las diferencias entre variedades fueron dadas por los metabolitos: prolina, valina, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico, ácido gálico, glucosa, acetato de etilo, 2,3-butanodiol, ácido láctico, colina, glicerol, ácido succínico y alanina.	42
2020	Se estudiaron 3 vinos de variedades tintas (Cabernet Sauvignon, Merlot y Cabernet Gernischt) provenientes de China. Los metabolitos encontrados fueron similares pero las concentraciones variaron. Aquellos que contribuyeron principalmente en las diferencias entre variedades fueron:	40

	acetato de etilo, ácido láctico, alanina, ácido succínico, prolina, ácido málico y ácido gálico.	
2020	Se formaron 8 grupos para el estudio de vinos de una variedad y vinos basados en esa variedad (ej. Syrah y basado en Syrah), de diferentes añadas y diferentes regiones griegas. Se logró la distinción entre variedades y regiones por análisis de ^{13}C RMN combinado con machine learning.	45
2021	Se analizaron 917 muestras de vinos checos de las variedades Riesling, Chardonnay, Pinot gris, Sauvignon blanc, Welschriesling, Pinot noir, Grüner Veltliner, Gewürtztraminer, Pinot blanc, Blaufränkish, Pálava, Cabernet sauvignon, Hibernál, Zweigeltrebe, Grüner Silvaner, Saint Laurent, Neuburger, Merlot, Muscat, Andre, Müller-Thurgau, Cabernet Moravia, Blauer Portugieser, Dornfelder, Kerner, Aurelius y Alibernet, de 5 sub-regiones de Moravia. Los metabolitos que hacían diferencias en cuanto a variedad fueron: prolina, fenilalanina, metanol, catequina, tirosina y epicatequina.	43

4.7.2. PROCESO DE FERMENTACIÓN Y REFINAMIENTO

Como ya se mencionó, existen dos procesos de fermentación durante la elaboración de un vino, la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, estos se han estudiado por RMN permitiendo el monitoreo de la transformación y niveles de los metabolitos más importantes en el vino⁴⁶, así como la distinción de los productos de fermentación de cada proceso.⁴⁷ Además de esto, se ha estudiado el comportamiento de las levaduras^{48,49,50} y bacterias⁵¹ implicadas en estos procesos.

Igualmente, para el refinamiento del perfil organoléptico del vino, se han hecho estudios por RMN para analizar el perfil aromático de los vinos cuando son sometidos a una covinificación¹⁴ o a un coupage⁵², así como la modificación del color o propiedades como la capacidad antioxidante⁵³. En la Tabla 4 se enlistan algunos de los estudios de proceso de fermentación y técnicas de refinamiento y su relevancia.

Tabla 4. Estudios por RMN aplicados al estudio de los procesos de fermentación y técnicas de mejora del perfil organoléptico del vino.

Año	Aplicación	Ref.
2009	Se monitoreó los niveles de los metabolitos importantes en el vino durante los procesos de fermentación alcohólica y maloláctica mediante qNMR. Se cuantificó: etanol, ácidos acético, málico, láctico y succínico, los aminoácidos prolina y alanina y la proporción prolina/arginina durante la fermentación del mosto de uvas Tempranillo.	46
2009	Se investigaron los cambios metabólicos en los mostos durante la fermentación alcohólica y los vinos durante el envejecimiento por 6 meses y el impacto en estos cambios de tres variantes de <i>Sacharomyces</i> . Los metabolitos responsables de las diferencias fueron: valina, 2,3-butanodiol, piruvato, succinato, prolina, citrato, glicerol, malato, tartrato, glucosa, ácido N-metilnicotínico y compuestos polifenólicos.	48
2009	Aislaron e identificaron la bacteria láctica (<i>L. plantarum</i>) presente en vino coreano Meoru y se comparó con vinos fermentados con la variedad <i>Oenococcus oeni</i> . Por RMN se identificaron 33 metabolitos y encontraron que los metabolitos responsables de la diferenciación por el proceso de fermentación maloláctica fueron: ácido láctico, fenilalanina, uracilo, ornitina, alanina, treonina, leucina, isoleucina y valina.	51
2010	Se estudió la transformación de varios aminoácidos (fenilalanina, leucina e isoleucina) en sus alcoholes superiores correspondientes (2-feniletanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico) durante la fermentación alcohólica, mostrando que los aminoácidos son totalmente consumidos en las primeras etapas del proceso.	47
2010	Se investigó por una caracterización sensorial la influencia de la covinificación en el perfil organoléptico de vinos hechos con variedades minoritarias cultivadas en La Mancha.	14
2011	Se usó la RMN para la caracterización de mezclas monovarietales binarias de vino Montepulciano (Mont; Mont+Merlot, Mont+Cabernet y Mont+Sangiovese) y se logró la clasificación y separación de las mezclas.	52
2012	Las covinificaciones se obtuvieron de co-maceraciones (1:1) de Tempranillo con otras variedades minoritarias de la región, además de mezclas (1:1:1) de Tempranillo con Bobal y Moravia Agria. Los perfiles fenólicos obtenidos de en las covinificaciones mostraron una mayor cantidad de compuestos diferentes que con la Tempranillo sola.	53
2013	Se utilizó la RMN para examinar el perfil molecular de un vino Blanco "Fiano di Avellino" fermentado con una cepa comercial y una cepa autóctona de <i>S. cerevisiae</i> . Los análisis estadísticos mostraron que el uso de diferentes cepas condujo a una diversidad significativa en los metabolomas del vino	49
2018	Se identificaron 22 metabolitos de los cuales 15 discriminaban el uso de los cultivos por separado de <i>Lachancea thermotolerans</i> y <i>S. cerevisiae</i> y 15 discriminaban a ambos cultivos durante la fermentación alcohólica.	50

4.8. HERRAMIENTAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS DEL PERFIL METABÓLICO

El estudio metabolómico por cualquier plataforma analítica, genera una gran cantidad de datos. El manejo, procesado, análisis e integración de estos datos requiere herramientas matemáticas, estadísticas y bioinformáticas especializadas.⁵⁴

Las herramientas utilizadas para interpretar los datos de metabolómica se adaptan principalmente de las tecnologías ómicas anteriores, desarrolladas principalmente para el análisis transcriptómico. Los enfoques analíticos clásicos tienen como objetivo evaluar las diferencias grupales, ya sea de manera univariada, es decir, parámetro por parámetro, o utilizando técnicas multivariadas.⁵⁵

4.8.1. ANÁLISIS UNIVARIADO

Este tipo de análisis es usado frecuentemente para reducir la dimensionalidad de los datos a aquellos que muestran la respuesta más fuerte bajo las condiciones investigadas. Las herramientas más utilizadas son: prueba t de Student y ANOVA (una o dos vías). Generalmente este tipo de métodos falla al intentar discriminar entre grupos si las diferencias son mínimas al nivel de molécula o inclusive si son combinaciones de múltiples moléculas a nivel de sistema.⁵⁶

4.8.2. ANÁLISIS MULTIVARIADO: QUIMIOMETRÍA.

Los métodos de análisis multivariados buscan capturar no sólo los cambios de metabolitos individuales entre diferentes grupos, sino también utilizar las estructuras de dependencia entre las moléculas individuales.

Generalmente, se conoce a la quimiometría como la ciencia de la estadística multivariada, pero la definición comúnmente aceptada es *“disciplina química que*

*usa métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar los procedimientos de medición óptimos y experimentos para proveer la máxima información química por el análisis de datos químicos”.*⁵⁷

La quimiometría provee métodos para reducir la cantidad de datos producidos por plataformas analíticas automatizadas, como la RMN⁵⁸ y permite la obtención de diferente información dependiendo del tipo de análisis que se realice, estos son: análisis no supervisado o descriptivo y análisis supervisado o predictivo.

- El análisis no supervisado se realiza cuando se buscan patrones o tendencias en una matriz.
- El análisis supervisado o predictivo se realiza al predecir características de interés acerca de una matriz utilizando información extra acerca de las muestras.⁵⁹

El análisis no supervisado más usado es el análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). Este simplifica la complejidad de los datos multi-dimensionales mientras retiene tendencias y patrones.⁶⁰ El PCA reduce los datos proyectándolos geoméricamente en menores dimensiones llamadas componentes principales (PCs), como se observa en la Figura 12 (lado izquierdo), esto con la finalidad de encontrar la mayoría de los datos en un número limitado de PCs. El primer PC minimiza la distancia entre los datos y su proyección en el PC y, al minimizar esta distancia, se maximiza la varianza de los puntos proyectados σ^2 . El segundo y los subsecuentes PCs son seleccionados de una forma similar, con la condición de que no están relacionados con los PCs anteriores.

El análisis supervisado es un proceso de clasificación, que tiene como objetivo la organización de las muestras en grupos predefinidos para la clasificación de nuevas muestras. Se dividen en clasificadores paramétricos y no paramétricos. Entre los modelos paramétricos se encuentran el análisis discriminante (DA), el análisis discriminante lineal (LDA), el análisis discriminante cuadrático (QDA), el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y el análisis discriminante ortogonal por mínimos cuadrados parciales (OPLS-DA). El OPLS-DA está basado en dos métodos, el PLS y el OSC (correlación ortogonal de señal),

requiere dos matrices, una descriptora X (datos espectrales) y una matriz respuesta Y. El OPLS usa la información en la matriz Y para descomponer la matriz X en bloques de variación estructurada correlacionados a un vector ortogonal Y. Existe una rotación de la información, lo que permite la separación de las variables dado un descriptor determinado (Figura 12, lado derecho).

Una de las ventajas del OPLS-DA recae en la habilidad de separar variación predictiva y no predictiva (ortogonal).⁶¹

En los análisis no supervisados y supervisados, se obtienen:

- Scores: Denotan las coordenadas de las variables sobre los componentes principales.
- Loadings: Explica cuáles son las variables originales que marcan el comportamiento de las tendencias o agrupaciones en las nuevas variables.
- VIPs (por sus siglas en inglés, *Variable Importance in the Projection*): Refiere a las variables más importantes en el modelo.

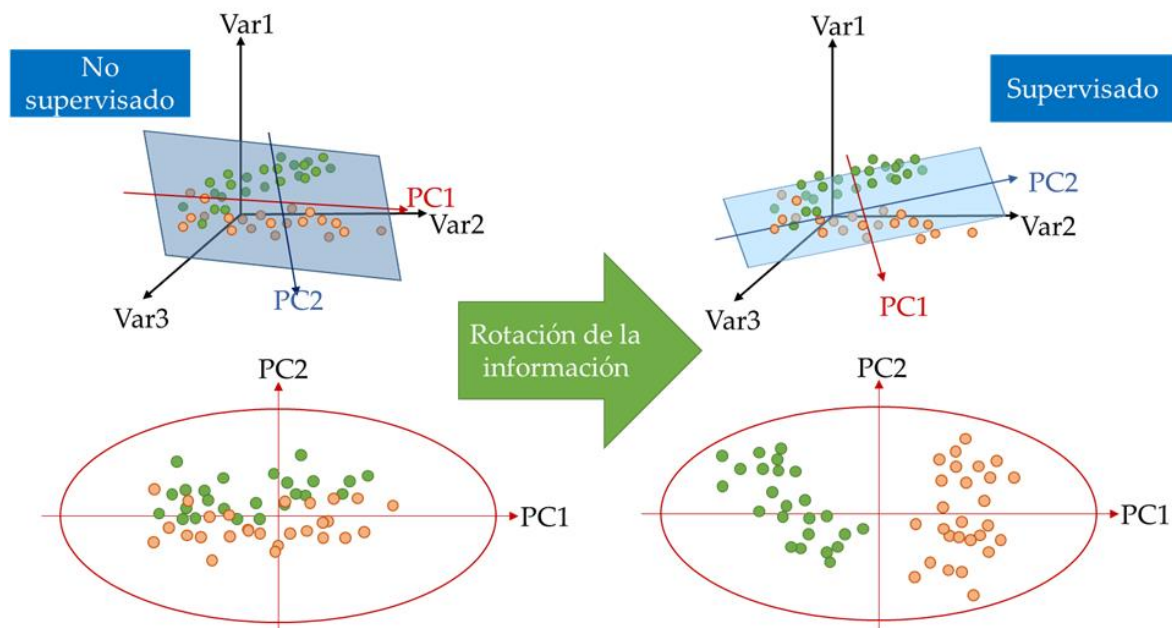


Figura 12. Representación vectorial de un análisis no supervisado y supervisado.

5. METODOLOGÍA

El equipo empleado fue un espectrómetro Bruker Avance III HD de 700 MHz para ^1H (campo magnético de 16.44 T, Figura 13), equipado con una sonda criogénica CPTCI (criosonda) de tres canales para $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ con bobina de gradientes en el eje z y un automuestreador “SampleJet”. Los espectros se adquirieron con el programa TopSpin (versión 3.5, Bruker).



Figura 13. Espectrómetro Bruker Avance III HD de 700 MHz para ^1H (campo magnético de 16.44 T), equipado con una criosonda y un automuestreador “SampleJet”.

5.1. PRUEBAS DE DESEMPEÑO DEL EQUIPO

5.1.1. CALIBRACIÓN DE TEMPERATURA

Para calibrar la temperatura del equipo se utilizó una muestra estándar de MeOD- d_4 en un tubo sellado: MeOD- d_4 (99.8% metanol- d_4 , Bruker).

Experimento: Calibración de baja temperatura (180 K-300 K)

Secuencia: zg30

Parámetros: D1: 1 s, AQ: 2.32 s, NS: 1, DS: 0, SW: 14097 Hz, RG: 18.0.

5.1.2. CALIBRACIÓN DE PRESATURACIÓN

Para la prueba de la sensibilidad del espectrómetro y la supresión de la señal del agua se utiliza la muestra estándar de sacarosa⁶² en un tubo sellado. Sacarosa (2mM, 0.5 mM DSS, 2 mM NaN₃, 90-10% H₂O-D₂O, Bruker).

Experimento: Test de supresión de agua

Secuencia: zgpr

Parámetros: D1: 10 s, AQ: 2.32 s, NS: 8, DS: 4, SW: 14097 Hz, RG: 25.4.

5.2. MUESTRAS DE VINO

Las muestras analizadas en la presente tesis se muestran en la Tabla 5, fueron botellas comerciales de vino mexicano del estado de Baja California Norte, así como vinificaciones experimentales realizadas también con uvas procedentes de valles del estado (información completa de muestras en Anexo 1).

Tabla 5. Muestras para análisis directo.

Muestras comerciales y vinificaciones EEG monovarietales							
Variedad	CETYS	CMV	C-EEG	V-EEG	μV-EEG	C (Europea)*	Total
Cabernet Sauvignon	18	11	-	3	-	2	34
Barbera	-	-	2	-	5	1	8
Nebbiolo	-	-	7	4	6	1	18
Total	18	11	9	7	11	4	60

*Tienda “La Europea”

5.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El vino se analizó al momento de abrir la botella, de ésta se transfirieron 900 μL de vino a un criovial estéril de 2 mL (T309-2A, Simport), éste se colocó en un pozo del sistema de agitación de la unidad Bruker de titulación y pH automático (BTpH, Figura 14), se seleccionó el tipo de muestra a ajustar “wine”, con los parámetros pre-cargados (pH final y velocidad de agitación). El equipo adicionó

automáticamente 100 μL de buffer de fosfatos (1 M KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, 99%) con TSP como estándar interno (0.1 % v/v, 90-10% H_2O - D_2O , Sigma-Aldrich, 98 %) y ajustó el pH a 3.1 con microadiciones de ácido clorhídrico (1 N) e hidróxido de sodio (1 M) si era necesario. Finalmente se transfirieron 600 μL de la mezcla a un tubo de RMN de 5 mm de diámetro.



Figura 14. Unidad BTpH.

5.4. PARÁMETROS DE ADQUISICIÓN DE EXPERIMENTOS DE RMN

Experimento: ^1H -RMN con supresión de agua y etanol

Secuencia: noesygppszgpr1d

Parámetros: D1: 4 s, AQ: 2.32 s, NS: 32, DS: 4, SW: 14097 Hz, RG: 16.0.

Disolvente: $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10)

5.5. PROCESAMIENTO

Antes del análisis estadístico, es importante el procesamiento adecuado de los espectros de RMN, los cuales, como primer paso, tienen que referenciarse a un estándar interno, ya que esto permite la adecuada identificación de compuestos y la alineación de señales. La corrección de la fase es un proceso que pretende

maximizar la simetría de los picos en todas las regiones del espectro de RMN y evitar distorsiones en la región cercana a la señal del disolvente. La corrección de la línea base es fundamental para eliminar artefactos provenientes de distorsiones electrónicas, filtrado digital inadecuado o muestreo digital incompleto; un mal fasado y corrección de línea base tiene repercusiones en la alineación espectral, el binning y la integración, lo que conduce a resultados incorrectos en los análisis estadísticos y la cuantificación.⁶³

El procesado se realizó en los programas de TopSpin (versión 3.5, Bruker) y MestReNova (versión 12.0.0, Mestrelab Research S.L. 2017). Se corrigió la fase (apk0.noe) y se ajustó la línea base de forma manual. Los espectros se referenciaron y normalizaron a la señal de TSP (singulete en 0 ppm).

5.6. PRE-PROCESAMIENTO

El pre-procesamiento de los datos para el análisis quimiométrico es necesario para eliminar variación indeseada de artefactos experimentales o instrumentales. Este proceso comienza con la normalización a una señal de referencia (como el estándar interno), ya que permite la comparación entre espectros removiendo el efecto de dilución en las muestras, es un proceso independiente en cada muestra. Posteriormente, se realiza el empaquetamiento de información o binning, que transforma los datos espectrales en “paquetes” de información que incluye la información en un rango de ppm, estos se acomodan en una matriz donde las columnas representan las variables y las filas a las muestras. El centrado y el escalado tienen como propósito que todas las columnas (variables) tengan la misma media (centrado) y la misma varianza (escalado). Las operaciones de escalado dependen de todas las muestras en la matriz y existen diferentes tipos de escalado.⁶⁴

Los escalados más comunes usados en metabolómica son:

- Varianza unitaria (UV, por sus siglas en inglés, Unit Variance): resta el valor de la media al valor de la variable y la divide entre su desviación estándar.

- Pareto (Par): resta el valor de la media al valor de la variable y la divide entre la raíz cuadrada de su desviación estándar.

Para el pre-procesado de los datos espectroscópicos se utilizó el software Chenomx (versión 8.3), donde se corrigió la línea base automáticamente de cada espectro y se realizó el empaquetamiento de información (binning) con un tamaño de 0.04 ppm en un rango de espectro de (9.5-0.5 ppm), excluyendo las señales de agua (4.94-4.74) ppm y etanol, así como sus satélites (3.77-3.72, 3.67-3.61, 3.56-3.49, 1.29-1.25, 1.20-1.15, 1.10-1.06 ppm) y se utilizó el método de bin inteligente para que la señal del ácido acético y el glicerol, que presentaban un pequeño desalineado, estuvieran dentro del mismo bin, el rango de estos fue de 2.14-2.11, 2.11-2.04 y 3.58-3.52 ppm respectivamente, al igual que con los bins de 9.18-9.06, 8.86-8.78, 8.70-8.62, 8.46-8.38, 8.38-8.32, 8.32-8.26 ppm, en la región de –OH de los polifenoles, finalmente se extrajo la matriz y se guardaron los datos. Con el software Excel (versión 2016, Microsoft®) se modificó la matriz. La matriz fue exportada para su análisis con la herramienta para análisis multivariante SIMCA (versión 16.0.1, Umetrics).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se muestran los espectros típicos de una muestra de vino, en los que se indica la asignación de los metabolitos, y posteriormente se muestran los resultados del análisis quimiométrico.

6.1. ESPECTROS DE RMN DE VINOS.

En la Figura 15, se muestran tres espectros ^1H -RMN superpuestos de cada una de las tres variedades de vino analizado: Cabernet Sauvignon (azul), Nebbiolo (rojo) y Barbera (verde). La identificación de algunos metabolitos está señalada en los espectros. Visualmente, se observan claras diferencias en la intensidad de las señales entre los espectros, particularmente en el espectro de Cabernet Sauvignon en la región alifática (0.8 a 3 ppm) las señales de la prolina (2.0 ppm y 2.35 ppm) y en la región aromática (5.51 a 9.3 ppm) las señales de la catequina (6.0 y 6.09 ppm), epicatequina (6.07 y 6.1 ppm) y trigonelina (8.84 y 9.14 ppm). En el espectro de Nebbiolo, en la región alifática se observan aumentadas las señales del ácido málico (2.79 y 2.89 ppm), en la región de carbohidratos (3.01 a 5.5 ppm) la señal del glicerol (3.55 ppm) y la xilosa (5.17 ppm) y, en la región aromática la señal del ácido caféico (6.43 ppm). Por último, en el espectro de Barbera, en la región de carbohidratos se observa aumentada la señal de glucosa (5.21 ppm).

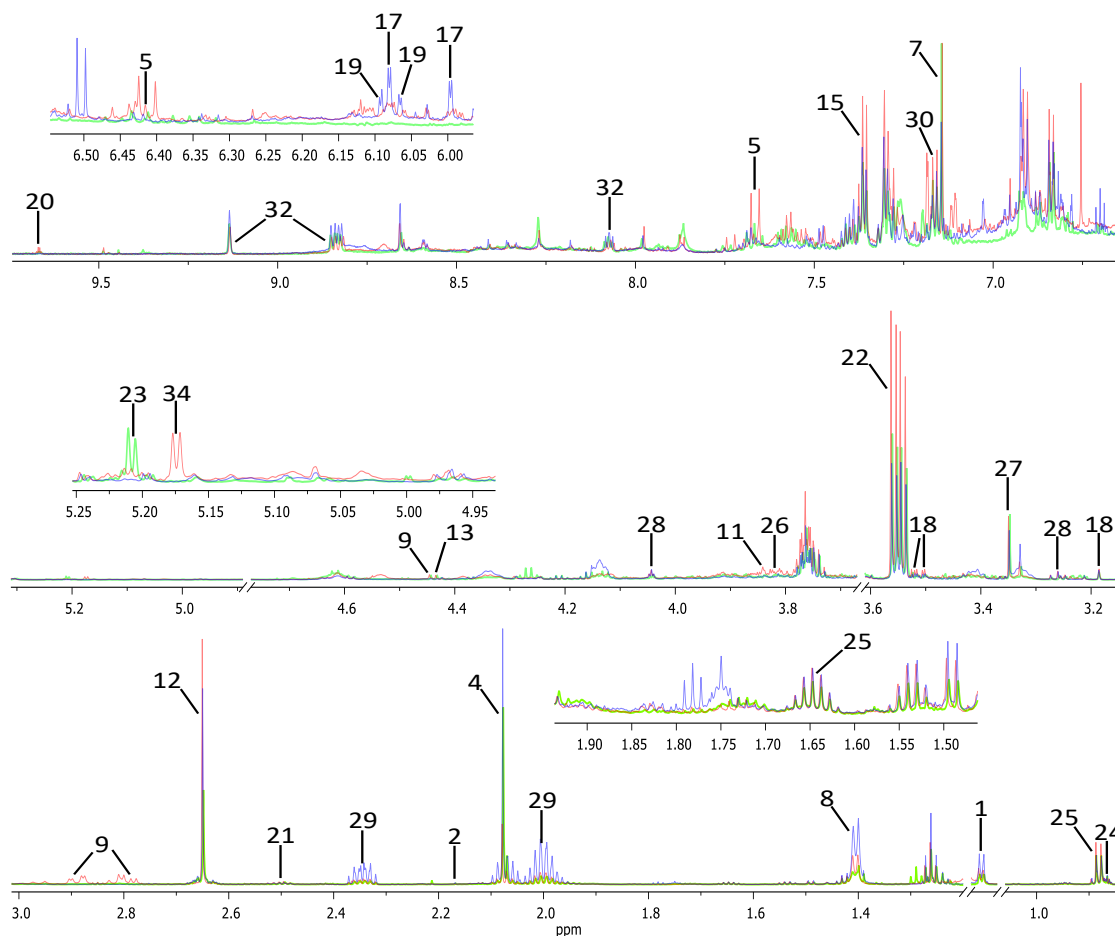


Figura 15. Espectro 1H-RMN (700 MHz, 300 K) de muestras de vino Barbera (verde), Nebbiolo (rojo) y Cabernet Sauvignon (azul) con identificación de metabolitos: 1) 2,3-butanodiol, 2) Acetoina, 4) Ácido acético, 5) Ácido caféico, 8) Ácido láctico, 9) Ácido málico, 11) Ácido siríngico, 12) Ácido succínico, 15) Alcohol fenílico, 17) Catequina, 18) Colina, 19) Epicatequina, 20) Etanal, 21) GABA, 22) Glicerol, 23) Glucosa, 24) Isobutanol, 25) Isopentanol, 26) Manitol, 27) Metanol, 28) Mio-inositol, 29) Prolina, 30) Tirosina, 32) Trigonelina, 34) Xilosa.

6.2. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS.

La identificación de los metabolitos se hizo con los espectros de todas las muestras analizadas, tanto los espectros de los diferentes vinos monovarietales (Barbera, Nebbiolo y Cabernet Sauvignon), así como en las mezclas y las cofermentaciones. Se utilizaron referencias de la literatura y la base de datos del software Chenomx (versión 8.3) y en total se lograron identificar 34 metabolitos que se presentan en la

Tabla 6 junto con el desplazamiento químico, la multiplicidad, la constante de acoplamiento y la asignación de las señales.

Tabla 6. Metabolitos identificados en las diferentes muestras de vino.

No.	Compuesto	$\delta^1\text{H}$ en ppm (multiplicidad, J en Hz, asignación)
1	2,3-butanodiol	1.13(d, 6.04, 2CH ₃)
2	Acetoina	1.36(d, 7.15, CH ₃); 2.21(s, CH ₃); 4.43(m, CH)
3	Acetato de etilo	4.13(q, CH ₂)
4	Ácido acético	2.07(s, CH ₃)
5	Ácido caféico	6.43(d, 16.02, CH); 7.68(d, 15.99, CH)
6	Ácido fumárico	6.71(s, 2CH)
7	Ácido gálico	7.15(s, 2CH)
8	Ácido láctico	1.39(d, 6.86, CH ₃);
9	Ácido málico	2.79(dd, 16.38 y 7.06, CH); 2.89(dd, 16.33 y 4.24, CH); 4.45(s, CH)
10	Ácido shikímico	6.80(m, CH)
11	Ácido siríngico	3.84(s, 2CH ₃); 7.25(s, 2CH)
12	Ácido succínico	2.65(s, α,β CH ₂)
13	Ácido tartárico	4.41(s, CH)
14	Alanina	1.48(d, 7.24, CH ₃);
15	Alcohol fenetílico	3.74(CH ₂ OH); 7.29(m, CH); 7.37(m, CH) (7.34)
16	Arginina	1.71(m, CH ₂); 1.89(m, CH ₂); 3.26 (t, $J = 6.7$, CH ₂)
17	Catequina	6.00(d, 2.28, CH); 6.09(d, 2.21, CH)
18	Colina	3.18(s, 3CH ₃); 3.51(dd, 9.94 y 2.89, CH ₂); 4.05(m, CH ₂)
19	Epicatequina	6.07(d, 2.33, CH); 6.10(d, 2.30, CH)
20	Etanal	2.23(d, 2.84, CH ₃); 9.67(q, CH)
21	GABA	2.49(t, 7.21, CH ₂)
22	Glicerol	3.55(dd, 11.68 y 6.49)
23	Glucosa	4.59(d, 7.90, CH); 5.21(d, 3.68, CH)
24	Isobutanol	0.87(d, 6.77, CH ₃); 1.74(m, CH); 3.36(d, 6.57, CH ₂ OH)
25	Isopentanol	0.88(d, 6.67, CH ₃); 1.65(m, CH ₂);
26	Manitol	3.75(m, CH); 3.79(d, 8.45, CH ₂); 3.82(dd, 11.73 y 2.78, CH ₂)
27	Metanol	3.35(s, CH ₃)
28	Mio-inositol	3.26(t, 9.39, CH); 4.04(t, 2.95, CH)
29	Prolina	2.0(m, CH ₂); 2.34(m, CH);
30	Tirosina	6.89(m, 2CH); 7.17(m, 2CH)
31	Treonina	1.32(d, 6.6, CH ₃)
32	Trigonelina	8.08(m, CH); 8.84(m, 2CH); 9.14(s, CH)

33	Valina	0.99(d, 7.0, CH ₃); 1.04(d, 6.92, CH ₃)
34	Xilosa	5.17(d, 3.80, CH)

6.3. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO.

Se realizaron dos estudios, el primero fue para saber si existe una diferencia entre las variedades de vino, y el segundo para conocer las diferencias entre un proceso de covinificación y el mezclado de dos variedades.

6.3.1. ESTUDIO DE LA VARIEDAD DE UVA

Para conocer si se podían diferenciar las variedades de uva, se utilizaron las muestras enlistadas anteriormente en la Tabla 5; 8 vinos Barbera, 18 Nebbiolo y 34 Cabernet Sauvignon (total=60 vinos). Primero se aplicó el método no supervisado de PCA y luego el supervisado de OPLS-DA. En ambos casos, para la generación de los modelos se probaron dos diferentes escalados, varianza unitaria (UV) y Pareto (Par).

La Figura 16 muestra el gráfico del análisis de PCA con escalado UV, con un valor de ajuste $R^2X = 0.826$ y de predicción $Q^2 = 0.621$. Se observa una tendencia de agrupación a lo largo de PC2 de las muestras de Cabernet Sauvignon orientadas hacia valores positivos del PCA, mientras que las muestras de Nebbiolo y Barbera se encuentran distribuidas en valores negativos. En la gráfica también se muestra la elipse de confianza, o Hotelling T², donde se observa un valor atípico de una de las muestras de Barbera bajo un nivel de significancia de $p = 0.05$, sin embargo este valor no fue excluido de los análisis subsecuentes.

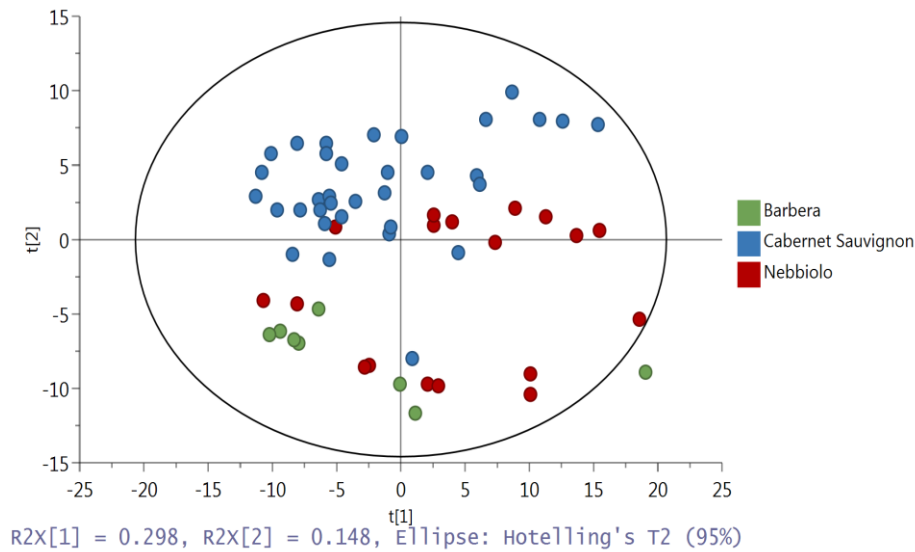


Figura 16. PCA con escalado UV ($R^2X(PC1) = 0.298, R^2X(PC2) = 0.148$) de muestras de vinos monovarietales, Barbera (verde), Nebbiolo (rojo) y Cabernet Sauvignon (azul).

Posteriormente, se realizó el análisis supervisado de OPLS-DA en el que se le dio la información de la variedad de uva al modelo (Figura 17). Con un valor de ajuste $R^2Y = 0.926$ y de predicción $Q^2 = 0.788$, la información del PC1 logra diferenciar la variedad Cabernet Sauvignon del resto de variedades (Nebbiolo y Barbera), mientras que Nebbiolo y Barbera se diferencian entre sí a lo largo del PC2 con valores positivos para Barbera y valores negativos para Nebbiolo. En el gráfico se muestra el Hotelling T2, donde se observa que tres muestras de Barbera sobresalen de la elipse.

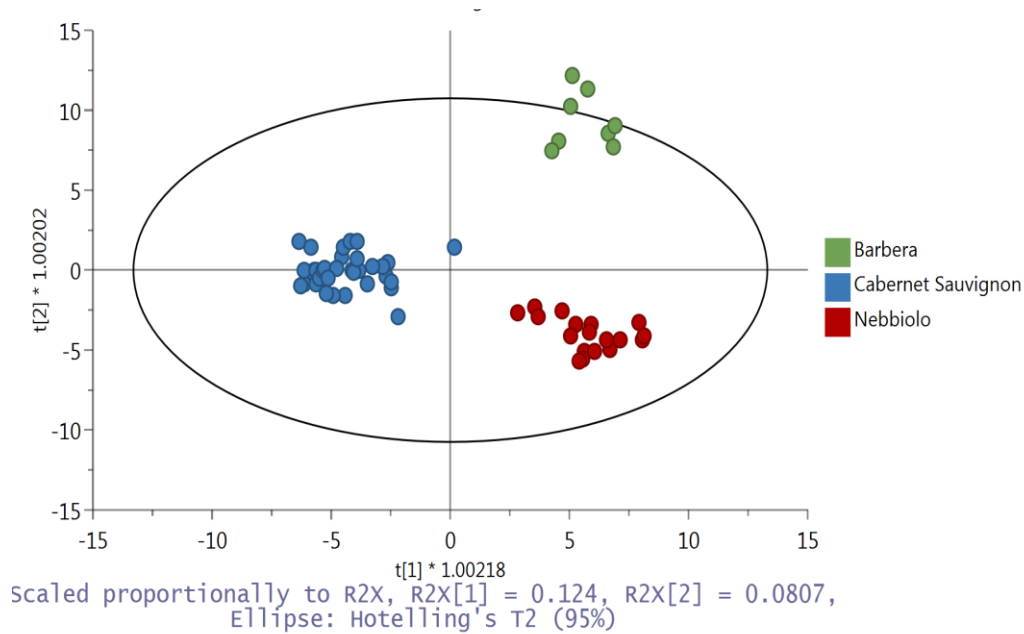


Figura 17. OPLS-DA con escalado UV ($R^2Y = 0.926$, PC1 y PC2) de muestras de vinos monovarietales, Barbera (verde), Nebbiolo (rojo) y Cabernet Sauvignon (azul).

Los mismos análisis se realizaron con el escalado Pareto. En el PCA (Figura 18), con un valor de ajuste $R^2X = 0.866$ y de predicción $Q^2 = 0.572$, se observa una tendencia de agrupación a lo largo de PC2 de las muestras de Cabernet Sauvignon orientadas hacia valores negativos del PCA, mientras que las muestras de Nebbiolo y Barbera se encuentran distribuidas en valores positivos. En la gráfica sobresale también que existen cinco valores atípicos, dos de las muestras de Cabernet Sauvignon y tres de las muestras de Nebbiolo bajo un nivel de significancia de $p = 0.05$, sin embargo estos valores no fueron excluidos de los análisis subsecuentes.

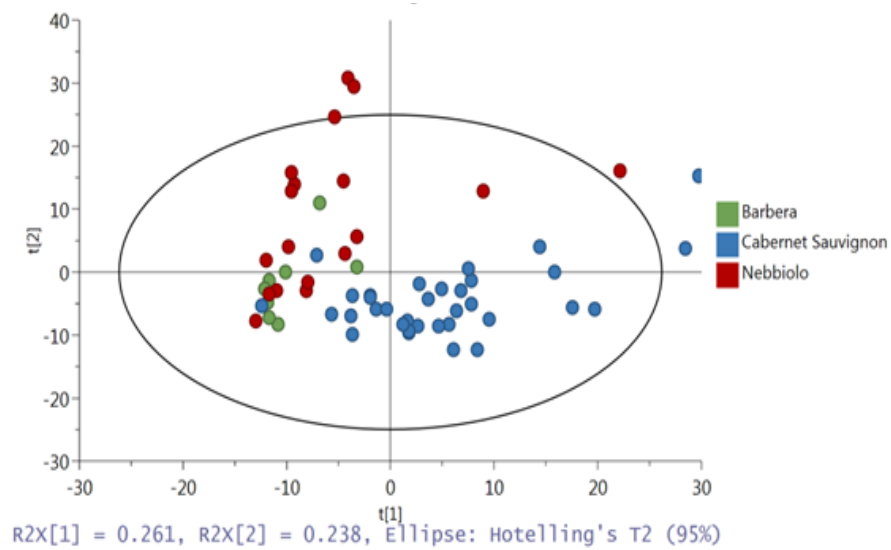


Figura 18. PCA con escalado Pareto (R^2X (PC1) = 0.261, R^2X (PC2) = 0.238) de muestras de vinos monovarietales Barbera (verde), Nebbiolo (rojo), Cabernet Sauvignon (azul).

Se realizó el análisis OPLS-DA (Figura 19) y, al igual que en el modelo con escalado UV, con un valor de ajuste $R^2Y = 0.789$ y de predicción $Q^2 = 0.631$, la información del PC1 logra diferenciar la variedad Cabernet Sauvignon del resto de Nebbiolo y Barbera y éstas se diferencian entre sí a lo largo del PC2 con valores positivos para Barbera y valores negativos para Nebbiolo. En el gráfico se observan dos muestras de Barbera que sobresalen del Hotelling T2.

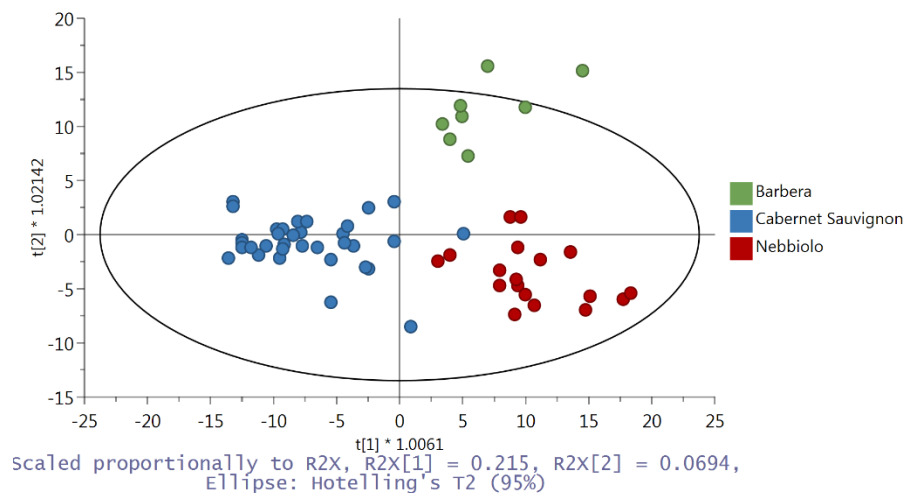


Figura 19. OPLS-DA con escalado Par ($R^2Y = 0.789$, PC1 y PC2) de muestras de vinos monovarietales Barbera (verde), Nebbiolo (rojo), Cabernet Sauvignon (azul) con escalado Pareto.

Comparado con el escalado UV, a pesar de que se observa la separación de grupos por variedad y una cantidad menor de anómalos, las muestras se encuentran más dispersas entre sí y algunas de Cabernet Sauvignon parecen agruparse en Nebbiolo, además de que los valores de R^2X , R^2Y y Q^2 son menores con el escalado de Pareto. Dado el resultado anterior, se decidió que el mejor escalado para distinguir entre variedades era el de UV.

Para verificar la correcta clasificación de las muestras, se generó una tabla de confusión, donde cada renglón representa las muestras en su clase predicha, mientras que las columnas representan las muestras en su clase actual o verdadera. En la Tabla 7, se observa la tabla de confusión para el modelo con escalado UV de las muestras de vino de 3 variedades, donde, todas las muestras que alimentaron el modelo están correctamente clasificadas.

Tabla 7. Tabla de confusión para el modelo (escalado UV) de 3 variedades de vino (Barbera, Cabernet Sauvignon y Nebbiolo).

	Muestras	Correcto	Nebbiolo	Barbera	Cabernet Sauvignon	Sin clase (YPred<=0)
Nebbiolo	18	100%	18	0	0	0
Barbera	8	100%	0	8	0	0
Cabernet Sauvignon	34	100%	0	0	34	0
Sin Clase	0		0	0	0	0
Total	60	100%	18	8	34	0
Probabilidad Fisher: 5.6e-09						

Igualmente, se obtuvo el agrupamiento jerárquico por variedad, que es un método de análisis de grupos puntuales para construir una jerarquía de grupos. En el caso del modelo con escalado UV de las muestras de vino (Figura 20), la estrategia para el agrupamiento jerárquico fue divisivo, pues todas las observaciones comenzaron en un grupo, y se realizaron divisiones mientras bajaban en la jerarquía, esto quiere decir que, en el primer nivel se encuentran como “vinos”, después se observan dos ramas, en las que se separan los vinos de Cabernet

Sauvignon (azul) de las demás. Finalmente se observan dos nuevas ramas, en las que se separan Barbera (verde) de Nebbiolo (rojo).

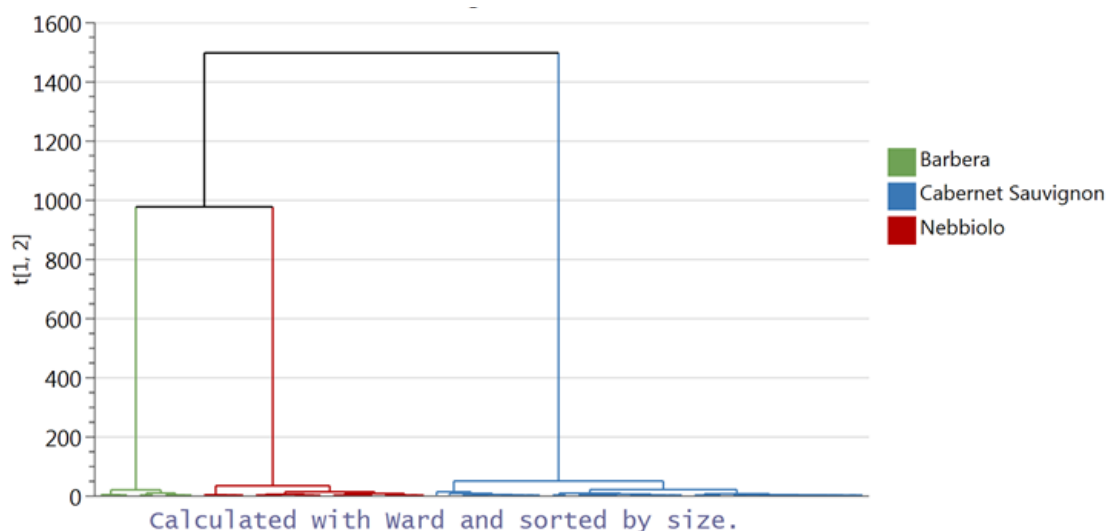


Figura 20. Agrupamiento jerárquico para el modelo (escalado UV) de vinos Barbera (verde), Cabernet Sauvignon (azul) y Nebbiolo (rojo).

Se procedió a averiguar cuáles eran los metabolitos responsables de estas diferencias. Para esto, se realizaron los modelos de PCA y OPLS-DA para Cabernet Sauvignon y Barbera (Figura 21), Cabernet Sauvignon y Nebbiolo (Figura 22) y Barbera y Nebbiolo (Figura 23).

En la Figura 21, en el PCA (R^2X (PC1) = 0.289, R^2X (PC2) = 0.185), con un valor de ajuste $R^2X = 0.851$ y de predicción $Q^2 = 0.583$, se observa una tendencia de agrupación a lo largo de PC2 de las muestras de Cabernet Sauvignon orientadas hacia valores negativos del PCA, mientras que las muestras de Barbera se encuentran distribuidas en valores positivos. También se observa que una muestra de Barbera sale de la elipse de confianza. En el OPLS-DA (derecha), con un valor de ajuste $R^2Y = 0.920$ y de predicción $Q^2 = 0.871$ la información del PC1 logra diferenciar las variedades. Al igual que en el modelo de PCA, una muestra de Barbera se encuentra fuera de la elipse de confianza.

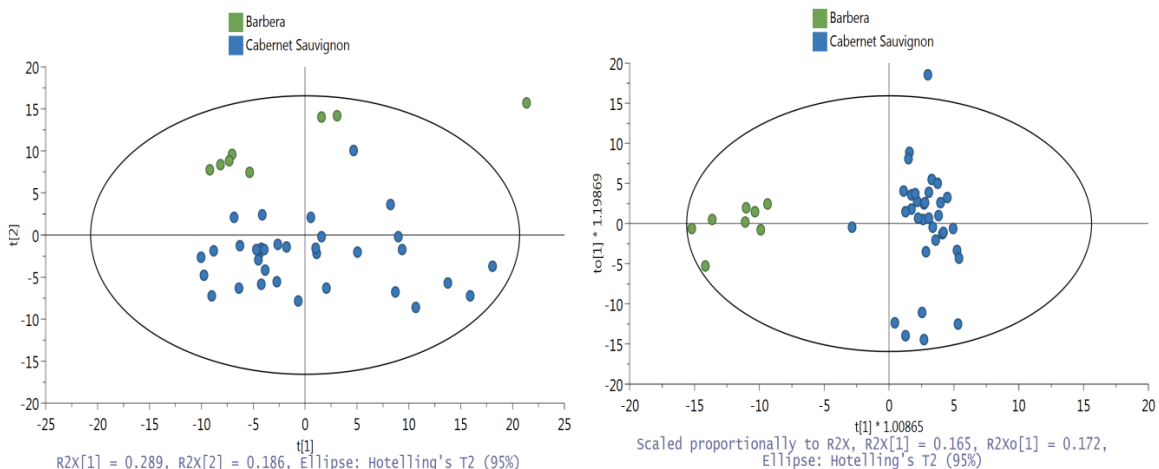


Figura 21. PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las muestras de vino de variedad Barbera (verde) y Cabernet Sauvignon (azul).

Del análisis de OPLS-DA, se obtuvo la lista de loadings y VIPs, para la identificación de los compuestos que hacen la diferencia entre variedades. En la Tabla 8, se muestra los resultados de la identificación de las señales de los metabolitos en el rango del bin con respecto a los VIPs, considerando un punto de corte de $VIP > 1.3$.

Tabla 8. Metabolitos identificados en los de VIPs (> 1.3) del modelo OPLS de Barbera y Cabernet Sauvignon.

	Rango de bin	Metabolito/s
1.68	1.06-1.1.02	Valina
1.62	6.06-6.02	Epicatequina
1.57	1.74-1.7	Arginina, isobutanol
1.56	1.02-0.98	Valina
1.54	6.1-6.06	Epicatequina
1.53	3.3-3.26	Arginina, mio-inositol
1.52	3.26-3.22	Mio-inositol
1.49	6.02-5.98	Catequina
1.45	1.5-1.46	Alanina
1.40	6.86-6.82	Tirosina
1.38	6.94-6.9	Ácido caféico
1.35	2.38-2.34	Prolina
1.33	6.34-6.3	Ácido caféico
1.29	2.04-2.0	Prolina

En la Tabla 9 se enlistan los loadings con un valor de corte de $\text{loading} > 1$ y los metabolitos identificados, además de la intensidad relativa de los metabolitos, de esto se puede decir que, comparado con los vinos Barbera, los Cabernet Sauvignon contienen niveles más altos de Arginina, Epicatequina y Prolina, mientras que el contenido de Valina, Isobutanol, Mio-inositol y Alanina es menor.

Tabla 9. Metabolitos identificados en los Loadings (>1) del modelo OPLS de Barbera y Cabernet Sauvignon.

	Rango de bin	Metabolito/s	Intensidad relativa de Cabernet frente a Barbera
-0.12	1.06-1.02	Valina	↓
-0.118	1.74-1.7	Isobutanol	↓
-0.117	1.02-0.98	Valina	↓
-0.111	3.26-3.22	Mio-inositol	↓
-0.10	1.5-1.46	Alanina	↓
0.10	2.38-2.34	Prolina	↑
0.101	6.1-6.06	Epicatequina	↑
0.109	6.06-6.02	Epicatequina	↑
0.11	3.3-3.26	Arginina	↑

En la Figura 22, en el PCA de las muestras de Nebbiolo y Cabernet Sauvignon (R^2X (PC1) = 0.326, R^2X (PC2) = 0.148, con un valor de ajuste $R^2X = 0.843$ y de predicción $Q^2 = 0.640$) se observa una tendencia de agrupación a lo largo de PC2 de las muestras de Cabernet Sauvignon orientadas hacia valores negativos del PCA, mientras que algunas de las muestras de Nebbiolo se encuentran distribuidas en valores positivos. Se observa además, que dos muestras de Nebbiolo están en la frontera del Hotelling T2. En el OPLS-DA (derecha), con un valor de ajuste $R^2Y = 0.965$ y de predicción $Q^2 = 0.790$, la información del PC1 logra diferenciar las variedades y, sólo una muestra de Nebbiolo se encuentra fuera de la elipse.

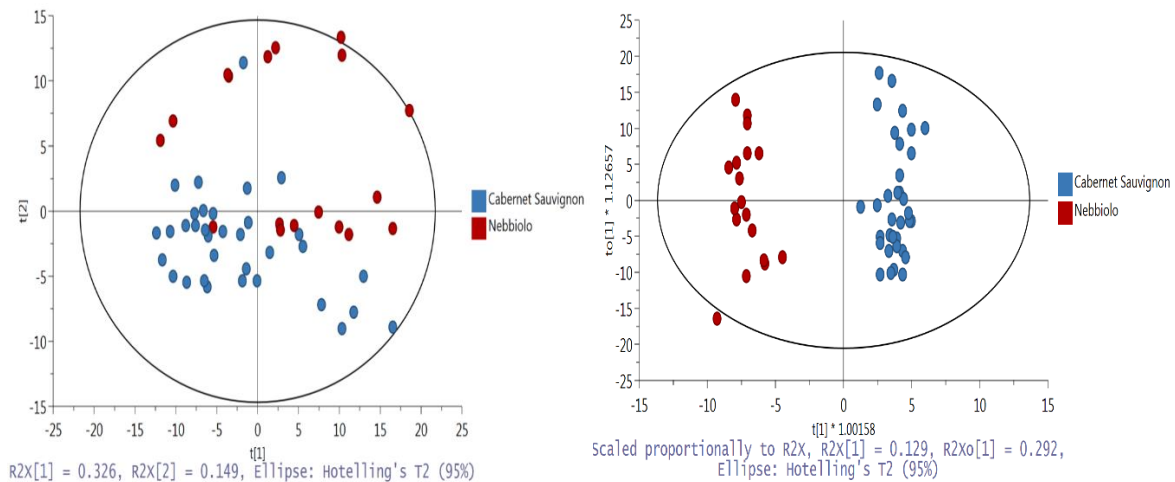


Figura 22. PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las muestras de vino de variedad Nebbiolo (rojo) y Cabernet Sauvignon (azul).

En la Tabla 10, se enlistan los VIPs y los metabolitos identificados en los bins que hacen la diferencia entre estas variedades. Se observan aminoácidos (Valina, Arginina, Alanina, y Prolina) y el Ácido caféico, que se sabe son marcadores de variedad, pues provienen directamente de la uva.

Tabla 10. Metabolitos identificados en los VIPs (>1.3) del modelo OPLS de Cabernet Sauvignon y Nebbiolo.

	Rango de bin	Metabolito/s
1.7	7.62-7.58	Ácido caféico
1.51	1.74-1.7	Arginina, isobutanol
1.50	2.38-2.34	Prolina
1.48	2.04-2.0	Prolina
1.46	2.34-2.3	Prolina
1.45	7.58-7.54	Ácido caféico
1.43	3.86-3.82	Manitol
1.42	2.54-2.5	GABA
1.41	1.06-1.02	Valina
1.37	3.82-3.78	Manitol
1.348	1.5-1.46	Alanina
1.346	1.02-0.98	Valina
1.33	2.5-2.46	GABA
1.2924	7.42-7.38	Alcohol fenético
1.2923	8.86-8.82	Trigonelina

En la Tabla 11 se enlistan los loadings con la identificación de los metabolitos, además de la intensidad relativa de los mismos. Se puede decir que comparado con los vinos Nebbiolo, los Cabernet Sauvignon contienen niveles más altos de Prolina, mientras que el contenido de Ácido caféico, Trigonelina, Arginina, Isobutanol, Manitol, Valina, y Alanina es menor.

Tabla 11. Metabolitos identificados en los Loadings (>1) del modelo OPLS de Cabernet Sauvignon y Nebbiolo.

	Rango de bin	Metabolito/s	Intensidad relativa de Cabernet frente a Nebbiolo
-0.13	7.62-7.58	Ác. caféico	↓
-0.117	1.74-1.7	Arginina, isobutanol	↓
-0.112	3.86-3.82	Manitol	↓
-0.111	7.58-7.54	Ác. caféico	↓
-0.11069	1.06-1.02	Valina	↓
-0.11068	1.5-1.46	Alanina	↓
-0.109	2.54-2.5	GABA	↓
-0.105	3.82-3.78	Manitol	↓
-0.103	1.02-0.98	Valina	↓
0.111	2.38-2.34	Prolina	↑
0.114	2.04-2.0	Prolina	↑
0.115	2.34-2.3	Prolina	↑

La Figura 23 muestra para los vinos Barbera y Nebbiolo el PCA (R^2X (PC1) = 0.342, R^2X (PC2) = 0.151) de lado izquierdo, con un valor de ajuste $R^2X = 0.860$ y de predicción $Q^2 = 0.557$, se observa una tendencia de agrupación a lo largo de PC1 de las muestras de Barbera orientadas hacia valores negativos del PCA, mientras que las muestras de Nebbiolo se encuentran distribuidas en valores positivos. Se observa además, que una muestra de Barbera está en la frontera de la elipse de confianza, a pesar de esto, se decidió no excluirla en modelos posteriores. En el OPLS-DA (derecha), con un valor de ajuste $R^2Y = 0.983$ y de predicción $Q^2 = 0.946$, la información del PC1 logra diferenciar las variedades y, sólo una muestra de Barbera sale de la elipse.

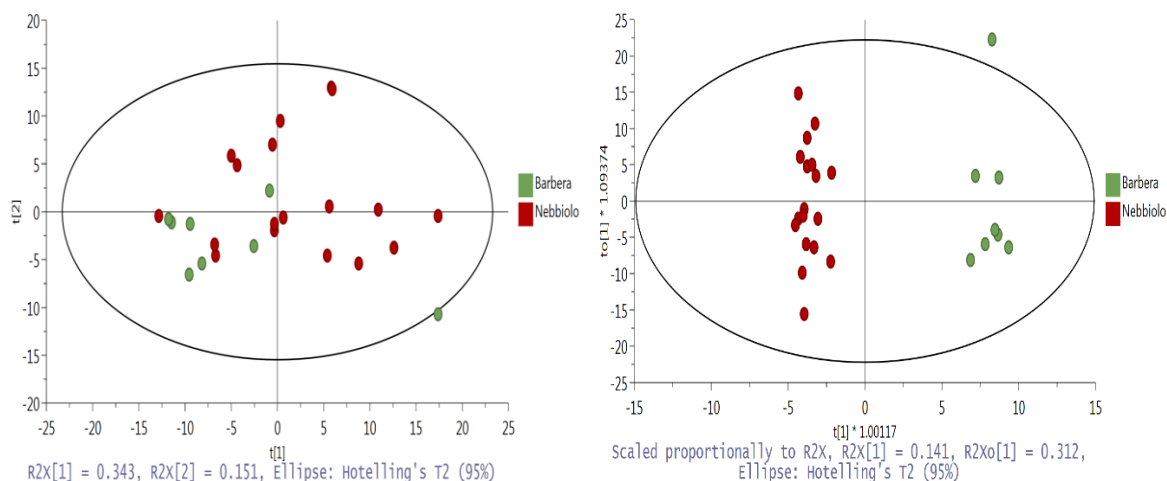


Figura 23. PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las muestras de vino de variedad Nebbiolo (rojo) y Barbera (verde).

Igualmente en este modelo, los VIPs que se enlistan en la Tabla 12 junto con los metabolitos identificados que hacen la diferencia entre estas variedades. En la lista de VIPs se observan aminoácidos (Arginina y Tirosina), compuestos fenólicos (Epicatequina, Catequina y Ácido caféico) además de azúcares (Glucosa, Xilosa) que se sabe son marcadores de variedad, pues provienen directamente de la uva.

Tabla 12. Identificación de VIPs (>1.3) del modelo OPLS de Nebbiolo y Barbera.

	Rango de bin	Metabolito/s
1.711	6.06-6.02	Epicatequina
1.680	6.02-5.98	Catequina
1.606	6.1-6.06	Epicatequina
1.590	3.3-3.26	Arginina, mio-inositol
1.529	7.38-7.34	Alcohol fenético
1.521	4.66-4.62	Glucosa
1.511	7.34-7.3	Alcohol fenético
1.474	9.18-9.14	Trigonelina
1.462	6.34-6.3	Ácido caféico
1.460	6.38-6.34	Ácido caféico
1.421	6.94-6.9	Ácido caféico
1.411	6.86-6.82	Tirosina
1.384	4.42-4.38	Trigonelina
1.375	3.26-3.22	Moi-inositol

1.326	3.18-3.14	Colina
1.322	5.22-5.18	Glucosa, Xilosa
1.309	7.14-7.1	Ácido gálico
1.285	2.54-2.5	GABA

En la Tabla 13 se enlistan los loadings, la identificación y la intensidad relativa de los metabolitos. Comparado con los vinos Nebbiolo, los Barbera contienen niveles más altos de Glucosa y Mio-inositol, mientras que el contenido de Epicatequina, Catequina, Arginina, Alcohol fenético, Trigonelina, Ácido caféico, Tirosina y Colina es menor.

Tabla 13. Identificación de Loadings (>1) del modelo OPLS de Nebbiolo y Barbera.

	Rango de bin	Metabolito/s	Intensidad relativa de Barbera frente a Nebbiolo
-0.135	6.06-6.02	Epicatequina	↓
-0.133	6.02-5.98	Catequina	↓
-0.125	3.3-3.26	Arginina	↓
-0.124	6.1-6.06	Epicatequina	↓
-0.120	7.38-7.34	Alcohol fenético	↓
-0.116	7.34-7.3	Alcohol fenético	↓
-0.112	4.42-4.38	Trigonelina	↓
-0.111	6.38-6.34	Ác. caféico	↓
-0.109	6.34-6.3	Ác. caféico	↓
-0.105	6.94-6.9	Ác. caféico	↓
-0.103	6.86-6.82	Tirosina	↓
-0.100	3.18-3.14	Colina	↓
0.100	3.26-3.22	Mio-inositol	↑
0.121	4.66-4.62	Glucosa	↑

6.3.2. ESTUDIO DEL PROCESO DE COVINIFICACIÓN Y DEL MEZCLADO DE VINOS

El siguiente análisis se hizo para conocer las diferencias entre un proceso de covinificación y el mezclado de dos variedades para la producción de un vino

mutivarietal. Se utilizaron las muestras de las variedades Nebbiolo y Barbera enlistadas en la Tabla 5, 6 muestras de covinificaciones (Anexo 1), 6 micromezclas realizadas en el laboratorio tanto de vinos comerciales como de las microvinificaciones y un vino comercial Nebbiolo/Barbera proporcionado por la EEG (total=38 muestras).

Al igual que en el estudio anterior, primero se probó qué escalado permitía la mejor clasificación. En la Figura 24 se muestra el PCA (izquierda) y el OPLS-DA (derecha) con escalado de varianza unitaria y en la Figura 25 se muestran los mismos modelos con escalado Pareto.

En el PCA (R^2X (PC1) = 0.351, R^2X (PC2) = 0.155) de la Figura 24, con un valor de ajuste $R^2X = 0.846$ y de predicción $Q^2 = 0.591$, se observan 2 grupos a lo largo de PC2 en función del tipo de muestra (microvinificación o comercial), el grupo comercial está orientado hacia valores negativos en PC2, mientras que el grupo de microvinificaciones se orienta hacia valores positivos. En dicho PCA no se logra apreciar una agrupación por variedad o proceso. En el OPLS-DA (derecha), con un valor de ajuste $R^2Y = 0.545$ y de predicción $Q^2 = 0.305$, la información del PC1 logra diferenciar las variedades y el tipo de proceso y en PC2 se observa la diferencia por tipo de variedad. En los dos modelos, todas las muestras se encuentran dentro de la elipse de confianza.

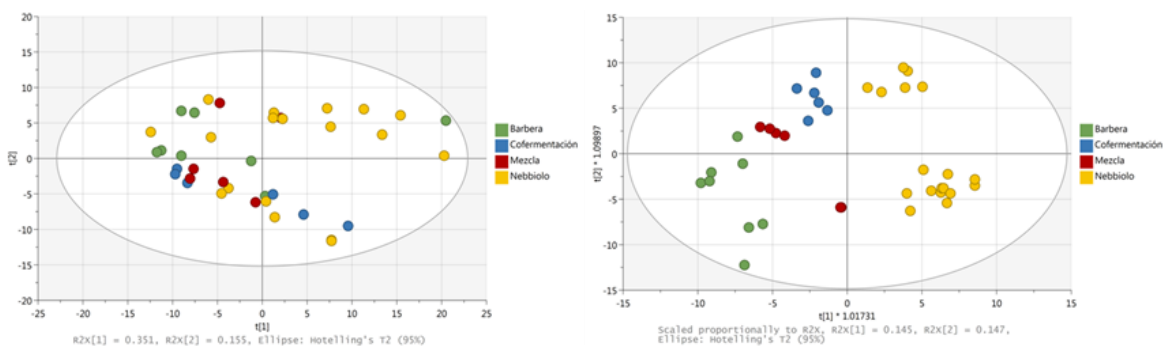


Figura 24. PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las muestras de vino Nebbiolo (amarillo), Barbera (verde), covinificaciones (azul) y mezclas (rojo) con escalado UV.

En la Figura 25, en el PCA (R^2X (PC1) = 0.325, R^2X (PC2) = 0.206), con un valor de ajuste $R^2X = 0.926$ y de predicción $Q^2 = 0.525$, se observan dos muestras

Nebbiolo que salen de la elipse de confianza, y no hay alguna agrupación por variedad o proceso. En el OPLS-DA (derecha), con un valor de ajuste $R^2Y = 0.480$ y de predicción $Q^2 = 0.221$, la información del PC1 logra diferenciar las variedades y el tipo de proceso.

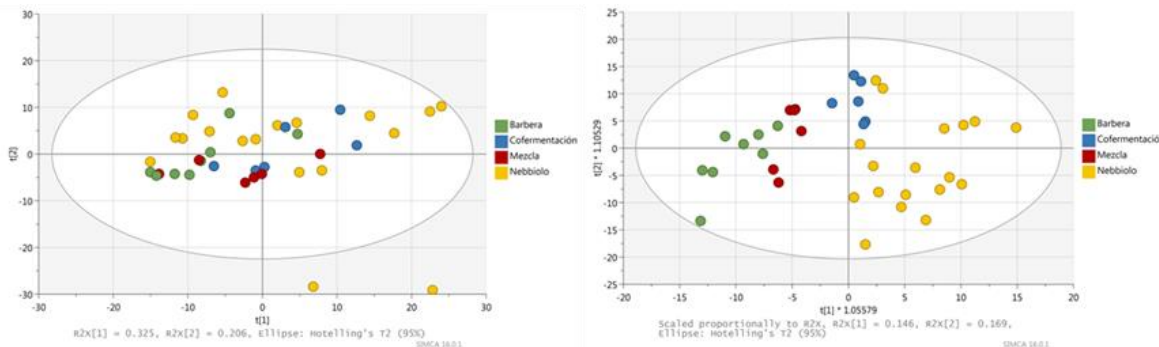


Figura 25. PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las muestras de vino Nebbiolo (amarillo), Barbera (verde), covinificaciones (azul) y mezclas (rojo) con escalado Pareto.

Haciendo la comparación entre escalados, UV logra diferenciar claramente entre variedades y procesos, pero también agrupa por tipo de muestra (microvinificación y comercial), mientras que Pareto evita la agrupación por tipo de muestra pero los grupos de variedades y proceso no se definen plenamente, además de que dos de las muestras no entraron en el intervalo de confianza. Dado el resultado anterior, se decidió que el mejor escalado para distinguir entre variedades y procesos era el de Pareto.

Posteriormente se procedió a averiguar cuáles eran los metabolitos responsables de estas diferencias. Para observar mejor, se realizaron análisis de PCA y OPLS-DA para mezclas y covinificaciones. En el PCA (R^2X (PC1) = 0.514, R^2X (PC2) = 0.242) de lado izquierdo de la Figura 26, con un valor de ajuste $R^2X = 0.965$ y de predicción $Q^2 = 0.800$, no se observa una agrupación para mezclas y covinificaciones. En el OPLS-DA (derecha), con un valor de ajuste $R^2Y = 0.980$ y de predicción $Q^2 = 0.937$, la información del PC1 logra diferenciar las covinificaciones. En los dos modelos, todas las muestras se encuentran dentro del Hotelling T2.

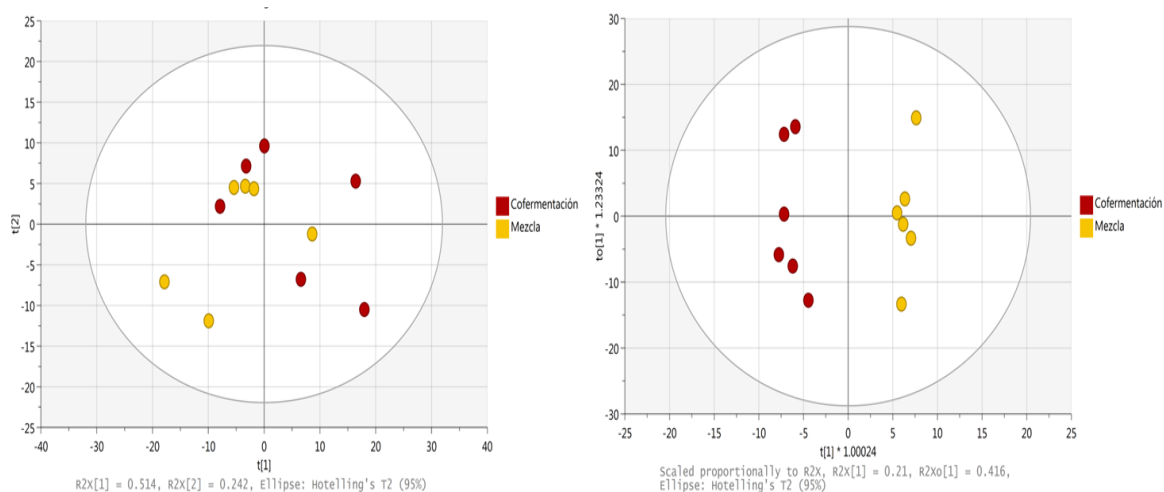


Figura 26. PCA (izquierda) y OPLS-DA (derecha) de las muestras de covinificaciones y mezclas (amarillo) con escalado Par.

Los VIPs con un corte de $VIP > 1$ del modelo OPLS-DA se enlistaron en la Tabla 14 y se identificaron los metabolitos que hacen la diferencia entre covinificaciones y mezclas.

Tabla 14. Identificación de VIPs (>1) del modelo OPLS de covinificaciones y mezclas.

	Rango de bin	Metabolito/s
4.847	1.14-1.1	2,3-butanodiol
4.428	3.58-3.52	Glicerol
4.023	2.11-2.04	Ácido acético, prolina
3.620	3.78-3.74	Manitol
3.306	2.66-2.62	Ácido succínico
3.036	4.62-4.58	Glucosa
2.650	3.82-3.78	Manitol
2.561	4.38-4.34	Ácido tartárico, ácido láctico
2.170	3.86-3.82	Manitol
1.731	4.42-4.38	Ácido tartárico
1.658	3.38-3.34	Metanol
1.481	1.38-1.34	Acetoína
1.295	2.04-2.0	Prolina
1.293	0.9-0.86	Isobutanol, isopentanol
1.279	3.9-3.86	Manitol
1.275	1.5-1.46	Alanina
1.176	3.5-3.46	Colina

1.172	4.06-4.02	Mio-inositol
1.099	3.34-3.3	Metanol
1.081	2.5-2.46	GABA
1.039	4.14-4.1	Fructosa

En la lista de VIPs se observan productos del proceso de fermentación como el 2,3-butanodiol, Glicerol, Ácido acético y GABA, además de azúcares (Glucosa, Fructosa) que podrían indicar un proceso de fermentación incompleto.

También se obtuvo la herramienta del modelo OPLS llamada línea S, ésta muestra con una escala de colores el valor de correlación de una variable con el modelo, por lo tanto, entre más se acerque el valor de la variable al color rojo, mayor es la diferencia que genera esta variable en los dos grupos de muestras. En la Figura 27 se muestra la línea S del modelo OPLS-DA de las muestras de Mezclas y Cavinificaciones y se señala cuáles son los metabolitos que representan las señales que sobresalen en el gráfico. De este, los metabolitos que generan mayor diferencia son: isobutanol e isopentanol, 2,3-butanodiol, acetoína, ácido acético, ácido succínico, glicerol, manitol, ácido tartárico y glucosa.

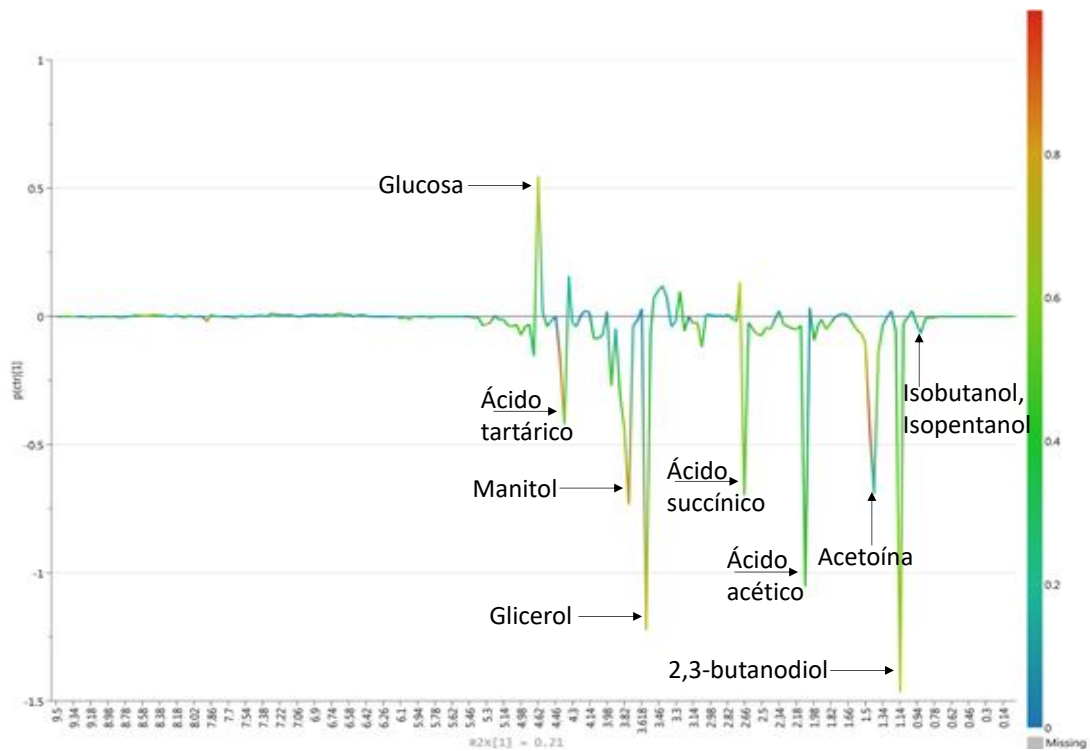


Figura 27. Línea S del modelo OPLS de Mezclas y Covinificaciones.

Tabla 15. Identificación de Loadings(>1) del modelo OPLS de Mezclas y Covinificaciones.

	Rango de bin	Metabolito/s	Intensidad relativa de Mezclas frente a Covinificaciones
-0.373	1.14-1.1	2,3-butanodiol	↓
-0.360	3.58-3.52	Glicerol	↓
-0.291	3.78-3.74	Manitol	↓
-0.262	2.11-2.04	Ácido acético, prolina	↓
-0.233	2.66-2.62	Ácido succínico	↓
-0.195	3.82-3.78, 3.86-3.82	Manitol	↓
-0.187	4.38-4.34	Ácido tartárico, ácido láctico	↓
-0.143	3.82-3.78, 3.86-3.82	Manitol	↓
-0.141	4.42-4.38	Ácido tartárico	↓
-0.107	1.38-1.34	Acetoína	↓
0.234	4.62-4.58	Glucosa	↑

Además, en la Tabla 15, se enlistan los loadings con un valor de corte de loading>1, la identificación y la intensidad relativa de los metabolitos. Gracias a esto se sabe que, comparado con las cavinificaciones, las mezclas contienen niveles más altos de Glucosa, mientras que el contenido de Ácido tartárico, Manitol, Glicerol, 2,3-butanodiol, Ácido láctico, Ácido acético, Ácido succínico y Acetoína es menor.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se analizaron, mediante experimentos ^1H RMN y análisis multivariado, 60 vinos (45 comerciales y 15 artesanales) producidos con uvas provenientes de distintos viñedos (Guadalupe, Santo Tomás, San Antonio de las Minas, Rancho San Gabriel, Rancho la Changa, Ojos Negros, San Vicente, Porvenir, Seco, Tierra Santa y San Jacinto) localizados en el estado de Baja California Norte.

En los espectros de ^1H RMN de las muestras se identificaron 34 compuestos.

Se seleccionaron los parámetros para los análisis multivariados que ajustaban mejor los datos espectrales, siendo el escalado de varianza unitaria el que permitió la discriminación de los vinos por la variedad de vid con la que fueron producidos y se identificaron los metabolitos que hacían la diferencia entre los grupos, siendo principalmente los aminoácidos (Valina, Arginina, Alanina, Tirosina y Prolina) y los compuestos fenólicos (Epicatequina, Catequina y Ácido caféico) para las tres variedades y azúcares (Glucosa y Xilosa) en Nebbiolo y Barbera.

También se identificó cuáles eran los compuestos que se encontraban en mayor y menor proporción en las 3 variedades, siendo la Prolina un claro marcador de la variedad de Cabernet Sauvignon pues se encontraba en mayor proporción frente a Nebbiolo y Barbera.

Para el estudio de métodos compensativos, igualmente se determinó que el escalado Pareto era el que mejor ajustaba a los datos espectrales, y se logró la separación del método de Mezcla y Covinificación. Se identificó que los metabolitos producto del proceso de fermentación como el 2,3-butanodiol, Glicerol, Ácido acético, metanol y GABA, además de azúcares (Glucosa, Fructosa) hacían la diferencia entre los métodos y las covinificaciones contenían una proporción mayor de Ácido tartárico, Manitol, Glicerol, 2,3-butanodiol, Ácido láctico, Ácido acético, Ácido succínico y Acetoína frente a las mezclas.

8. ANEXO.

Anexo 1. Información de los vinos tintos analizados.

Código	Tipo de uva	Variedad	Casa Productora	Año	Valle	Proporcionadas por
036-C	Tinta	Barbera	Santo Tomás	2015	Santo Tomás	-
051-C	Tinta	Barbera	Santo Tomás	2015	Santo Tomás	UABC
052-C	Tinta	Barbera/Cabernet Sauvignon	Casa Pedro Domecq	2016	Guadalupe	UABC
053-C	Tinta	Barbera/Tempranillo	Vinícola Retorno	2017	San Antonio de las Minas	UABC
054-C	Tinta	Barbera/Tempranillo	Vinícola Alto Tinto	2016	Santo Tomás	UABC
090-C	Tinta	Barbera/Ruby Cabernet	Código Domecq	2017	Guadalupe	UABC
101-C	Tinta	Barbera	Alximia	2011	Guadalupe	UABC
010-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	L.A. CETTO	2017	Guadalupe	-
043-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	L.A. CETTO	2017	Guadalupe	-
044-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Cousiño-Macul	2015	Del Maipo, Chile	-
091-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Viña Estefanya	2018	Central, Chile	-
092-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Antares	2017	Central, Chile	-
094-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Santa Carolina	2018	Central, Chile	-
104-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Lorenza	2018	Central, Chile	-
105-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Santo Tomás	2017	Rancho San Gabriel	CMV
106-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Santo Tomás	2016	Rancho La Changa	CMV
107-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	San Rafael	2015	Ojos Negros	CMV
108-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Surco 2.7	2015	San Vicente	CMV
109-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Bajalupano	2016	Porvenir	CMV
110-C	Tinta	Cabernet Sauvignon/Merlot	Monte Xanic	2017	Guadalupe	CMV
111-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Emeré	2014	Porvenir	CMV
112-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Pedro Domecq	2017	Guadalupe	CMV
113-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	La Carrodilla	2016	Porvenir	CMV
114-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Henri Luton	2016	San Vicente	CMV
115-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	El Cielo	2015	Guadalupe	CMV
116-C	Tinta	Cabernet Sauvignon	Melchum	2017	Guadalupe	CMV
037-C	Tinta	Nebbiolo	L.A. CETTO	2016	Guadalupe	-
045-C	Tinta	Nebbiolo/Barbera	Cuatro Niñas	2016	Porvenir	UABC
046-C	Tinta	Nebbiolo	Casa Magoni	2016	Guadalupe	UABC
047-C	Tinta	Nebbiolo	L.A. CETTO	2016	Guadalupe	UABC
048-C	Tinta	Nebbiolo	Monte Fiori	2016	Porvenir	UABC

049-C	Tinta	Nebbiolo	Trasiego	2016	Guadalupe	UABC
050-C	Tinta	Nebbiolo	Inspiración	2014	Guadalupe	UABC
102-C	Tinta	Nebbiolo	Inspiración	2016	San Vicente	UABC
103-C	Tinta	Nebbiolo	Relieve	2015	Guadalupe	UABC
038-C	Tinta	Zinfandel	L.A. CETTO	2016	Guadalupe	-
039-C	Tinta	Merlot	L.A. CETTO	2017	Guadalupe	-
040-C	Tinta	Petit Sirah	L.A. CETTO	2016	Guadalupe	-
015-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	San Vicente	UABC**
016-V	Tinta	Tempranillo	Vinificación	2018	San Vicente	UABC**
017-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinificación	2018	San Vicente	UABC**
055-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinificación	2019	San Vicente	UABC*
056-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2019	San Vicente	UABC**
057-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2019	San Vicente	UABC**
060-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2019	San Vicente	UABC**
063-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinificación	2019	San Vicente	UABC*
095-C	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Mezcla comercial	-	NA	-
096-C	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Mezcla comercial	-	NA	-
097-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Mezcla vinificación	2018	NA	-
098-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Mezcla vinificación	2018	NA	-
099-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Mezcla vinificación	2018	NA	-
100-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Mezcla vinificación	2018	NA	-
072-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinos Kruger	2019	Seco	CETYS
073-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	El Cielo	2019	Guadalupe	CETYS
074-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Concierto Enológico	2019	Tierra Santa	CETYS
075-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	El Cielo	2019	Ojos Negros	CETYS
076-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinos Kruger	2019	Guadalupe	CETYS
077-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	El Cielo	2019	Guadalupe	CETYS
078-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Roganto	2019	Guadalupe	CETYS
079-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	El Cielo	2019	Guadalupe	CETYS
080-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinícola Retorno	2019	Ojos Negros	CETYS
081-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Roganto	2018	San Antonio de las Minas	CETYS
082-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Cava El Laurel	2019	Ojos Negros	CETYS
083-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Roganto	2019	San Jacinto	CETYS
084-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Tres Valles	2019	Porvenir	CETYS
085-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	La Casa Vieja	2019	San Antonio de las Minas	CETYS
086-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Vinos Kruger	2018	Guadalupe	CETYS
087-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Tres de Vino	2019	San Jacinto	CETYS
088-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Tres de Vino	2019	San Vicente	CETYS
089-V	Tinta	Cabernet Sauvignon	Viñas de Liceaga	2019	San Antonio de las Minas	CETYS
011-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	Porvenir	UABC*

012-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	Porvenir	UABC*
013-V	Tinta	Barbera	Vinificación	2018	San Vicente	UABC*
014-V	Tinta	Barbera	Vinificación	2018	San Vicente	UABC*
018-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Covinificación	2018	NA	UABC*
019-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Covinificación	2018	NA	UABC*
020-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
021-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
022-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
023-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
024-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
025-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
026-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
027-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
028-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
029-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
030-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
031-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
032-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
033-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
034-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
035-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
058-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	Porvenir	UABC*
059-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Covinificación	2018	NA	UABC*
061-V	Tinta	Barbera	Vinificación	2018	San Vicente	UABC*
062-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	Porvenir	UABC*
064-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Covinificación	2018	NA	UABC*
065-V	Tinta	Barbera	Vinificación	2018	San Vicente	UABC*
066-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Vinificación	2018	NA	UABC*
067-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	Porvenir	UABC*
068-V	Tinta	Nebbiolo	Vinificación	2018	Porvenir	UABC*
069-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Covinificación	2018	NA	UABC*
070-V	Tinta	Barbera/Nebbiolo	Covinificación	2018	NA	UABC*
071-V	Tinta	Barbera	Vinificación	2018	San Vicente	UABC*

UABC* Vinificaciones realizadas por el doctor Rodrigo Alonso Villegas

UABC** Vinificaciones realizadas en la Facultad de Enología y Gastronomía

9. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Ribéreau-Gayon, P. (2006). *Handbook of enology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- ² Diamantidou, D., Zotou, A., & Theodoridis, G. (2018). Wine and grape marc spirits metabolomics. *Metabolomics*, 14(12), 159.
- ³ Aru, V., Sørensen, K. M., Khakimov, B., Toldam-Andersen, T. B., & Balling Engelsen, S. (2018). Cool-Climate Red Wines—Chemical Composition and Comparison of Two Protocols for 1H-NMR Analysis. *Molecules*, 23(1), 160.
- ⁴ Van Leeuwen, C. (2010). Terroir: the effect of the physical environment on vine growth, grape ripening and wine sensory attributes. In *Managing wine quality* (pp. 273-315). Woodhead Publishing.
- ⁵ Ribéreau-Gayon, P. (2006). *Handbook of enology*. Chichester: John Wiley & Sons.
- ⁶ Huang Z, Ough CS: Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1991;45:261–267.
- ⁷ Morata, A., & Loira, I. (Eds.). (2016). *Grape and Wine Biotechnology*. BoD—Books on Demand.
- ⁸ Butnariu, M., & Butu, A. (2019). The Evolution and the Development Phases of Wine. In *Alcoholic Beverages* (pp. 303-345). Woodhead Publishing.
- ⁹ Ciani, M., Comitini, F., & Mannazzu, I. (2013). Fermentation. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 310-321.
- ¹⁰ Gil-Sánchez, I., Bartolomé Suáldea, B., & Victoria Moreno-Arribas, M. (2019). *Malolactic Fermentation. Red Wine Technology*, 85–98.
- ¹¹ Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2013). *Principles and practices of winemaking*. Springer Science & Business Media.
- ¹² Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food research international*, 54(2), 1844-1858.
- ¹³ https://www.kobrandwineandspirits.com/system/uploads/education_resource/file_field/15/kob_educ_guide_WineMaking.pdf
- ¹⁴ García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., & Viñas, M. G. (2010). Influence of co-winemaking technique in sensory characteristics of new Spanish red wines. *Food quality and preference*, 21(7), 705-710.
- ¹⁵ Focus OIV. (2017). Distribution of the world's grapevine varieties. *OIV- International organization of vine and wine*. Recuperado de: <http://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>
- ¹⁶ OIV. (2020). 2019 Statistical Report on World Vitiviniculture. *OIV- International organization of vine and wine*. Recuperado de: <http://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>
- ¹⁷ Producción de vino en México. (2018). *Consejo Mexicano Vitivinícola*. Recuperado de: http://uvayvino.org.mx/html/docs/produccion_consumo_vino.pdf
- ¹⁸ Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A. (2017). From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 821.
- ¹⁹ Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y los mostos (2 vol.). (2018). *OIV*. Recuperado de: <http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/metodos-de-analisis/compendio-de-los-metodos-internacionales-de-analisis-de-los-vinos-y-de-los-mostos-2-vol>
- ²⁰ Horgan, R. P., & Kenny, L. C. (2011). ‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13(3), 189-195.
- ²¹ Rizo, J., Guillén, D., Farrés, A., Díaz-Ruiz, G., Sánchez, S., Wachter, C., & Rodríguez-Sanoja, R. (2020). Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 791-809.
- ²² Miggliels, P., Wouters, B., van Westen, G. J., Dubbelman, A. C., & Hankemeier, T. (2019). Novel technologies for metabolomics: More for less. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115323.
- ²³ Jacob, M., Lopata, A. L., Dasouki, M., & Abdel Rahman, A. M. (2019). Metabolomics toward personalized medicine. *Mass spectrometry reviews*, 38(3), 221-238.

- ²⁴ Mussap, M., Antonucci, R., Noto, A., & Fanos, V. (2013). The role of metabolomics in neonatal and pediatric laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*, *426*, 127-138.
- ²⁵ Takis, P. G., Ghini, V., Tenori, L., Turano, P., & Luchinat, C. (2019). Uniqueness of the NMR approach to metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *120*, 115300.
- ²⁶ Friebolin, H. (2005). Basic one- and two-dimensional NMR-spectroscopy.
- ²⁷ Simpson, J. H. (2011). *Organic structure determination using 2-D NMR spectroscopy: a problem-based approach*. Academic Press.
- ²⁸ Amargianitaki, M., & Spyros, A. (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *4*(1), 9.
- ²⁹ Monakhova, Y. B., Schäfer, H., Humpfer, E., Spraul, M., Kuballa, T., & Lachenmeier, D. W. (2011). Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ¹H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *49*(11), 734-739.
- ³⁰ Vignoli, A., Ghini, V., Meoni, G., Licari, C., Takis, P. G., Tenori, L.,... & Luchinat, C. (2019). High-throughput metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie International Edition*, *58*(4), 968-994.
- ³¹ Fan, S., Zhong, Q., Fauhl-Hassek, C., Pfister, M. K. H., Horn, B., & Huang, Z. (2018). Classification of Chinese wine varieties using ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control*, *88*, 113-122.
- ³² Gougeon, L., da Costa, G., Guyon, F., & Richard, T. (2019). ¹H NMR metabolomics applied to Bordeaux red wines. *Food chemistry*, *301*, 125257.
- ³³ Godelmann, R., Fang, F., Humpfer, E., Schütz, B., Bansbach, M., Schäfer, H., & Spraul, M. (2013). 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*, *61*(23), 5610-5619.
- ³⁴ Arvanitoyannis, I. S., Katsota, M. N., Psarra, E. P., Soufleros, E. H., & Kallithraka, S. (1999). Application of quality control methods for assessing wine authenticity: Use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science & Technology*, *10*(10), 321-336.
- ³⁵ Son, H. S., Kim, K. M., Van Den Berg, F., Hwang, G. S., Park, W. M., Lee, C. H., & Hong, Y. S. (2008). ¹H nuclear magnetic resonance-based metabolomic characterization of wines by grape varieties and production areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(17), 8007-8016.
- ³⁶ Rochfort, S., Ezernieks, V., Bastian, S. E., & Downey, M. O. (2010). Sensory attributes of wine influenced by variety and berry shading discriminated by NMR metabolomics. *Food Chemistry*, *121*(4), 1296-1304.
- ³⁷ Skogerson, K., Runnebaum, R. O. N., Wohlgemuth, G., De Ropp, J., Heymann, H., & Fiehn, O. (2009). Comparison of gas chromatography-coupled time-of-flight mass spectrometry and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolite identification in white wines from a sensory study investigating wine body. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(15), 6899-6907.
- ³⁸ Ali, K., Maltese, F., Toepfer, R., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2011). Metabolic characterization of Palatinate German white wines according to sensory attributes, varieties, and vintages using NMR spectroscopy and multivariate data analyses. *Journal of Biomolecular NMR*, *49*(3-4), 255-266.
- ³⁹ Geana, E. I., Popescu, R., Costinel, D., Dinca, O. R., Ionete, R. E., Stefanescu, I., ... & Bala, C. (2016). Classification of red wines using suitable markers coupled with multivariate statistical analysis. *Food chemistry*, *192*, 1015-1024.
- ⁴⁰ Hu, B., Gao, J., Xu, S., Zhu, J., Fan, X., & Zhou, X. (2020). Quality evaluation of different varieties of dry red wine based on nuclear magnetic resonance metabolomics. *Applied Biological Chemistry*, *63*, 1-8.
- ⁴¹ Son, H. S., Hwang, G. S., Ahn, H. J., Park, W. M., Lee, C. H., & Hong, Y. S. (2009). Characterization of wines from grape varieties through multivariate statistical analysis of ¹H NMR spectroscopic data. *Food Research International*, *42*(10), 1483-1491.
- ⁴² Zhu, J., Hu, B., Lu, J., & Xu, S. (2018). Analysis of metabolites in cabernet sauvignon and shiraz dry red wines from Shanxi by ¹H NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis. *Open Chemistry*, *16*(1), 446-452.

- ⁴³ Mascellani, A., Hoca, G., Babisz, M., Krska, P., Kloucek, P., & Havlik, J. (2021). ¹H NMR chemometric models for classification of Czech wine type and variety. *Food Chemistry*, 339, 127852.
- ⁴⁴ Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. (2017). 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*, 28(4), 259-277.
- ⁴⁵ Mannu, A., Karabagias, I. K., Di Pietro, M. E., Baldino, S., Karabagias, V. K., & Badeka, A. V. (2020). ¹³C NMR-based chemical fingerprint for the varietal and geographical discrimination of wines. *Foods*, 9(8), 1040.
- ⁴⁶ López-Rituerto, E., Cabredo, S., Lopez, M., Avenoz, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2009). A thorough study on the use of quantitative ¹H NMR in Rioja red wine fermentation processes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(6), 2112-2118.
- ⁴⁷ López-Rituerto, E., Avenoz, A., Busto, J. H., & Peregrina, J. M. (2010). Evidence of metabolic transformations of amino acids into higher alcohols through ¹³C NMR studies of wine alcoholic fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 4923-4927.
- ⁴⁸ Son, H. S., Hwang, G. S., Kim, K. M., Kim, E. Y., van den Berg, F., Park, W. M., ... & Hong, Y. S. (2009). ¹H NMR-based metabolomic approach for understanding the fermentation behaviors of wine yeast strains. *Analytical Chemistry*, 81(3), 1137-1145.
- ⁴⁹ Mazzei, P., Spaccini, R., Francesca, N., Moschetti, G., & Piccolo, A. (2013). Metabolomic by ¹H NMR spectroscopy differentiates "Fiano di Avellino" white wines obtained with different yeast strains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(45), 10816-10822.
- ⁵⁰ Peng, C., Viana, T., Petersen, M. A., Larsen, F. H., & Arneborg, N. (2018). Metabolic footprint analysis of metabolites that discriminate single and mixed yeast cultures at two key time-points during mixed culture alcoholic fermentations. *Metabolomics*, 14(7), 1-12.
- ⁵¹ Lee, J. E., Hwang, G. S., Lee, C. H., & Hong, Y. S. (2009). Metabolomics reveals alterations in both primary and secondary metabolites by wine bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10772-10783.
- ⁵² Imparato, G., Paolo, E. D., Braca, A., & Lamanna, R. (2011). Nuclear magnetic resonance profiling of wine blends. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4429-4434.
- ⁵³ Gallego, M. G., García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., Vinas, M. G., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2012). Effect of co-winemaking in phenolic composition, color and antioxidant capacity of young red wines from La Mancha region. *European Food Research and Technology*, 235(1), 155-167.
- ⁵⁴ Cambiaghi, A., Ferrario, M., & Masseroli, M. (2017). Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Briefings in bioinformatics*, 18(3), 498-510.
- ⁵⁵ Korman, A., Oh, A., Raskind, A., & Banks, D. (2012). Statistical methods in metabolomics. In *Evolutionary genomics* (pp. 381-413). Humana Press.
- ⁵⁶ Bartel, J., Krumsiek, J., & Theis, F. J. (2013). Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Computational and structural biotechnology journal*, 4(5), e201301009.
- ⁵⁷ Forina, M., Casale, M., & Oliveri, P. (2009). Application of chemometrics to food chemistry.
- ⁵⁸ Cornejo-Báez, A. A., Peña-Rodríguez, L. M., Alvarez-Zapata, R., Vazquez-Hernández, M., & Sánchez-Medina, A. (2019). Chemometrics: a complementary tool to guide the isolation of pharmacologically active natural products. *Drug discovery today*.
- ⁵⁹ Canizo, B. V., Escudero, L. B., Pellerano, R. G., & Wuilloud, R. G. (2019). Quality Monitoring and Authenticity Assessment of Wines: Analytical and Chemometric Methods. In *Quality Control in the Beverage Industry* (pp. 335-384). Academic Press.
- ⁶⁰ Lever, J., Krzywinski, M., & Altman, N. (2017). Points of significance: Principal component analysis.
- ⁶¹ Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E., & Trygg, J. (2006). OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *Journal of Chemometrics: A Journal of the Chemometrics Society*, 20(8-10), 341-351.

-
- ⁶² Deborde, C., Fontaine, J. X., Jacob, D., Botana, A., Nicaise, V., Richard-Forget, F.,... & Moing, A. (2019). Optimizing 1D 1 H-NMR profiling of plant samples for high throughput analysis: extract preparation, standardization, automation and spectra processing. *Metabolomics*, *15*(3), 28.
- ⁶³ Emwas, A. H., Saccenti, E., Gao, X., McKay, R. T., dos Santos, V. A. M., Roy, R., & Wishart, D. S. (2018). Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D 1 H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, *14*(3), 31.
- ⁶⁴ Euceda, L. R., Giskeødegård, G. F., & Bathen, T. F. (2015). Preprocessing of NMR metabolomics data. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, *75*(3), 193-203.