



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**IDENTIFICACIÓN POR RESONANCIA MAGNÉTICA  
NUCLEAR DE COMPUESTOS DE VINO TINTO  
EXTRAÍDOS EN CLOROFORMO DEUTERADO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**ALEJANDRA CARRILLO ALCÁNTARA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2023**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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:**                   **Profesor:** Reyes Salas Eugenio Octavio

**VOCAL:**                           **Profesor:** Ruíz Terán Francisco

**SECRETARIO:**               **Profesora:** Esturau Escofet Nuria

**1er. SUPLENTE:**               **Profesor:** Domínguez Romero Allan Noe

**2° SUPLENTE:**               **Profesora:** Rojo Portillo Tania

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

LABORATORIO UNIVERSITARIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR,  
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

## **ASESORA DEL TEMA:**

---

DRA. NURIA ESTURAU ESCOFET

## **SUPERVISORA TÉCNICA:**

---

DRA. RONNA DELGADO ALTAMIRANO

## **SUSTENTANTE:**

---

ALEJANDRA CARRILLO ALCÁNTARA

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química y al Instituto de Química, por ser parte de mi desarrollo profesional y personal a lo largo de estos años.

A la beca otorgada por el proyecto SAGARPA-CONACYT 2017-06-292836 "Plataforma Nacional de Metabolómica Basada en Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-OMICS) para la Solución de Problemas Nacionales del Sector Agroalimentario".

A la Dra. Nuria Esturau, por el tiempo, conocimientos y asesoría durante toda mi estadía en el proyecto.

A la Dra. Ronna Delgado, por su dedicación, paciencia y acompañamiento durante la realización de esta tesis; así como compartirme sus conocimientos y su amistad.

A mis padres Alejandra y Antonio, por su amor, apoyo incondicional y ser el mayor pilar en mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad, las risas y momentos compartidos.

A mis amigos y compañeros de la facultad, especialmente Gabriela, Ximena, Ulises y Charlie, por ser los mejores compañeros de equipo y excelentes amigos.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
3.1	OBJETIVO GENERAL .....	3
3.2	OBJETIVOS PARTICULARES .....	3
<b>4</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
4.1	VINO TINTO .....	4
4.1.1	<i>Composición del vino tinto</i> .....	4
4.1.2	<i>Compuestos no polares o de polaridad intermedia en el vino</i> .....	6
4.2	METABOLÓMICA.....	6
4.3	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	7
4.3.1	<i>Espectros de RMN monodimensionales</i> .....	8
4.3.2	<i>Espectros de RMN bidimensionales</i> .....	10
4.4	ESTUDIOS DEL VINO MEDIANTE METABOLÓMICA POR RMN .....	13
4.4.1	<i>Ventajas de la RMN</i> .....	14
4.4.2	<i>Limitaciones de la RMN</i> .....	14
4.4.3	<i>Extracción con cloroformo</i> .....	15
<b>5</b>	<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>16</b>
5.1	MUESTRAS.....	16
5.2	EXTRACCIÓN CON CLOROFORMO DEUTERADO .....	16
5.3	RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	17
5.3.1	<i>Preparación de muestras</i> .....	17
5.3.2	<i>Equipo</i> .....	17
5.3.3	<i>Adquisición de los espectros</i> .....	17
5.3.4	<i>Procesamiento de los espectros</i> .....	18
5.4	IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS/ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL .....	18
<b>6</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>

6.1	ESPECTRO DE PROTÓN DEL VINO TINTO MALBEC .....	19
6.1.1	<i>Elucidación estructural de los espectros uni- y bi-dimensionales</i> .....	21
6.2	METABOLITOS IDENTIFICADOS EN LA MUESTRA DE VINO TINTO MALBEC .....	29
6.3	COMPARACIÓN DE ESPECTROS DE PROTÓN ( <sup>1</sup> H-RMN) MALBEC Y “POOL” .....	35
6.4	ANÁLISIS DE METABOLITOS .....	37
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>48</b>
9.1	ANEXO I. INFORMACIÓN DE LOS VINOS TINTOS DEL “POOL” .....	48
9.2	ANEXO II. ESPECTROS DE <sup>1</sup> H-RMN CON DISTINTA RELACIÓN DE VINO:CDCl <sub>3</sub> .	49
9.3	ANEXO III. ESPECTROS DE RMN DEL VINO TINTO MALBEC .....	50
9.4	ANEXO IV. ESPECTROS DE RMN DEL “POOL” DE VINOS TINTOS .....	53
9.5	ANEXO V. ESPECTROS BIDIMENSIONALES CON LOS METABOLITOS ASIGNADOS DEL VINO TINTO MALBEC .....	56

## LISTADO DE ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

ACRÓNIMO O SÍMBOLO	SIGNIFICADO
$\delta$	Desplazamiento químico
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
COSY	Espectroscopía de correlación ( <i>CO</i> rrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i> )
HMBC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de enlaces múltiples ( <i>H</i> eteronuclear <i>M</i> ultiple- <i>B</i> ond <i>C</i> orrelation)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia ( <i>H</i> igh <i>P</i> erformance <i>L</i> iquid <i>C</i> hromatography)
HSQC	Espectroscopía de coherencia heteronuclear cuántica simple ( <i>H</i> eteronuclear <i>S</i> ingle- <i>Q</i> uantum <i>C</i> oherence)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
EM	Espectrometría de Masas
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TOCSY	Espectroscopía de correlación total ( <i>T</i> Otal <i>C</i> orrelation <i>S</i> pectroscop <i>Y</i> )

# 1 INTRODUCCIÓN

El vino tinto es una bebida alcohólica ampliamente consumida alrededor del mundo. Su composición está influenciada por múltiples factores, por ejemplo: la variedad de uva, el viñedo, la cepa de levadura utilizada, el *terroir*, el añejamiento, la ubicación geográfica y los procesos de fermentación o vinificación empleados. En los vinos están presentes diversos metabolitos primarios como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, lípidos, etc., además de metabolitos secundarios como alcoholes superiores, terpenos, fenoles y estilbenos, entre otros. Para su identificación es importante considerar que estos compuestos tienen diferentes polaridades, volatilidad y concentraciones, por lo que para su análisis la preparación de muestra es de gran importancia.

El análisis del vino no es sencillo y requiere de métodos robustos y eficaces para lograr su caracterización. Una ciencia que tiene gran aplicación en el estudio de los vinos es la metabolómica, cuyo objetivo es estudiar los metabolitos (moléculas de bajo peso molecular). Una de las técnicas analíticas usadas para estudios de metabolómica, que es robusta, rápida, versátil y no destructiva, es la espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). En la industria vitivinícola la metabolómica basada en RMN se suele utilizar principalmente para realizar la autenticación del vino. Un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Resonancia Magnética Nuclear de protón) se puede considerar como la huella dactilar molecular del vino, por lo que se puede obtener identificaciones o comparaciones entre distintos vinos. Con los espectros unidimensionales ( $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN) y bidimensionales (HSQC, COSY, HMBC y HSQC-TOCSY) es posible realizar la elucidación estructural de los metabolitos. La información química composicional que se obtiene por este método espectroscópico constituye el metaboloma del vino.

En la presente tesis se realiza un análisis de extractos de vino tinto utilizando como disolvente  $\text{CDCl}_3$  (cloroformo deuterado) para extraer compuestos no polares o de baja polaridad; y poder identificarlos mediante la técnica de RMN. Esto debido principalmente a la posibilidad de extraer y concentrar ciertos



metabolitos que puedan estar enmascarados con señales de compuestos más abundantes o que se encuentran en bajas concentraciones.

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

## **2 HIPÓTESIS**

Mediante una extracción con  $\text{CDCl}_3$ , se facilitará la identificación por RMN de compuestos minoritarios de baja y mediana polaridad de muestras de vino tinto.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Caracterizar por RMN uni- y bi-dimensional, los compuestos extraídos en  $\text{CDCl}_3$  de muestras de vino tinto.

### **3.2 Objetivos particulares**

- Encontrar la proporción adecuada de vino: $\text{CDCl}_3$  para extraer de manera óptima los compuestos no polares o de polaridad intermedia presentes en una muestra de vino tinto.
- Elucidar la estructura de los metabolitos extraídos con  $\text{CDCl}_3$ , mediante su análisis con experimentos uni- y bi-dimensionales de RMN.
- Comparar los compuestos identificados en la muestra de vino tinto monovarietal con un “pool” de vinos tintos de diferentes variedades de uva.

## **4 ANTECEDENTES**

### **4.1 Vino tinto**

El vino es una de las bebidas alcohólicas tradicionales más antiguas consumidas mundialmente (Fehér et al., 2007). Se produce exclusivamente por fermentación de uva o de mosto de uva (Hidalgo-Togores, 2018) y se puede clasificar según su coloración, composición, sabor y contenido alcohólico en: tinto, blanco, naranja o rosado; dulce, seco, semi-seco o de postre (Nemzer et al., 2022).

El vino está constituido por una gran cantidad de compuestos que incluyen agua, alcoholes, proteínas, aminoácidos, carbohidratos y polifenoles, entre otros (Polášková et al., 2008). El vino tiene una composición característica que depende de la calidad de las materias primas, como la uva, los regímenes en la fermentación alcohólica y las condiciones de añejamiento. La composición química de los vinos refleja la historia del proceso de su elaboración, incluida la cepa de levadura, la variedad de uva, el proceso de fermentación y las condiciones de almacenamiento, así como también el origen geográfico (Son et al., 2009).

#### **4.1.1 Composición del vino tinto**

La composición química del vino generalmente es: agua (86%), etanol (12%), glicerol, alcoholes superiores y polisacáridos (1%), ácidos orgánicos (0.4%), polifenoles como antocianinas y taninos (0.1%), minerales, compuestos volátiles y otros compuestos (0.5%). La concentración en la que usualmente se encuentran se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales componentes en el vino tinto y su cantidad (Nemzer et al., 2022).

COMPUESTOS QUÍMICOS	CONTENIDO
Glicerol	4-10 g/L
Ácidos orgánicos	>6 g/L
<b>Compuestos sulfurados:</b> sulfito	10-80 mg/L
<b>Compuestos nitrogenados:</b>	300 a 1300 mg/L
-Aminoácidos/proteínas	70-80 mg/L
-Alcoholes superiores	300-600 mg/L
-Alcohol isoamílico	140-417 mg/L
<b>Minerales:</b> potasio, nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio, calcio, boro, manganeso, hierro y otros	Total 1.5-3 g/L
<b>Flavonoides:</b>	
-Flavonoles	>100 mg/L
-Flavanoles	>800 mg/L
-Antocianinas	>700 mg/L
-Taninos condensados	1.2-3.3 g/L
-Taninos hidrolizables	>50 mg/L
Ácidos hidroxibenzoicos	2-500 mg/L
Ácidos hidroxicinámicos	>100 mg/L
Ácido gálico	>70 mg/L
Estilbenos	1.1-2.7 mg/L
Hidroxitirosol	>3.89 mg/L

De los ácidos orgánicos presentes en el vino, los principales son el tartárico, málico, cítrico, succínico y acético. Dentro de los compuestos nitrogenados se encuentran aminoácidos como la prolina, arginina, alanina, ácido glutámico, glutamina y  $\gamma$ -ácido aminobutírico. Los alcoholes superiores con más de dos carbonos son el 3-metilbutanol, 2-metilbutanol, 2-metilpropanol, propanol y 2-feniletanol (Nemzer et al., 2022).

Los flavonoides son el grupo más importante de compuestos en el vino tinto, se dividen en las subclases: flavonoles, flavanoles, flavanonas, flavonas, chalconas y taninos (Nemzer et al., 2022). Dentro de los compuestos no flavonoides están los ácidos fenólicos que constan de ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos (Gutiérrez-Escobar et al., 2021).

Otro grupo de compuestos son los ácidos grasos, de los cuales tienen mayor predominancia el palmítico, el mirístico y el láurico (Yunoki et al., 2004). Dentro del vino también se encuentran compuestos volátiles, como los ésteres y compuestos sulfurados (tioésteres, sulfuros, polisulfuros, tiosulfuros y heterociclos) (Gürbüz et al., 2013).

Respecto al aroma del vino, se han identificado más de 800 compuestos, como alcoholes, ácidos de ésteres orgánicos, aldehídos, éteres, cetonas, terpenos, etc. Los alcoholes son el grupo con mayor cantidad y concentración de compuestos aromáticos que se han identificado en el vino, seguidos por los ésteres y los ácidos grasos. De los alcoholes, principalmente son el alcohol isoamílico, 2-octanol, alcohol isobutílico y 2-feniletanol. De los ésteres, el acetato de etilo, acetato de isoamilo, lactato de etilo y octanoato de etilo (Jiang & Zhang, 2010).

#### **4.1.2 Compuestos no polares o de polaridad intermedia en el vino**

Los fenoles abarcan un considerable número de compuestos en el vino que pueden variar estructuralmente entre ellos, van desde los que presentan alta polaridad hasta moléculas no polares. Los compuestos fenólicos son de particular importancia ya que contribuyen a propiedades organolépticas y en la conservación del vino. De los compuestos fenólicos apolares se encuentran: el tirosol, flavonoides como la catequina, epicatequina, quercetina e isorhamnetina, un glucósido flavonoide (eriodictiol-7-glucósido), estilbenos como el trans- y cis-resveratrol (Greco et al., 2013) y taninos condensados (Mazauric & Salmon, 2006). Otros compuestos de baja polaridad son los ésteres, que son de gran importancia en el aroma del vino (Liu et al., 2005).

## **4.2 Metabolómica**

La metabolómica es el estudio del conjunto de pequeñas moléculas (<1500 Da), que en sistemas biológicos son conocidas como metabolitos. El conjunto de estas moléculas es el metaboloma. La metabolómica permite establecer patrones metabólicos “o huellas dactilares”. Recientemente, se suelen usar análisis metabolómicos para obtener información sobre metabolitos (aminoácidos, lípidos y

fitoquímicos) y evaluar las propiedades de los alimentos (Gao et al., 2021). En el caso de productos alimentarios permite obtener información de factores ambientales, genéticos (variedades y cultivares) y relativos a la elaboración, el suelo, el clima, los recursos genéticos, las condiciones de almacenamiento, etcétera; lo que permite la evaluación de la calidad de alimentos o la detección de adulteraciones (Burdisso et al., 2017).

Las huellas metabolómicas “o huellas dactilares” se pueden obtener usando diferentes técnicas instrumentales como Radiación Infrarroja (IR), Espectroscopía de Ultravioleta-Visible (UV-Vis), RMN, Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía Líquida (LC) y Electroforesis Capilar (EC), estas tres últimas acopladas a Espectrometría de Masas (EM) (Gao et al., 2021). No obstante, las más utilizadas son la RMN y la EM acoplada a técnicas de separación (Gao et al., 2021; Ralli et al., 2018).

### **4.3 Resonancia Magnética Nuclear**

La RMN es una técnica espectrométrica rápida y de alta reproducibilidad para obtener espectros que contienen información sobre la muestra analizada. Se basa en la observación de ciertos núcleos atómicos que tienen un momento magnético distinto de 0 y un momento angular intrínseco, es decir, poseen un número impar de protones o neutrones, o bien, tienen un espín mayor que cero. La RMN ocurre cuando los núcleos atómicos se colocan en un campo magnético intenso y absorben la energía necesaria para que cambien a otro estado energético. En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar, pero cuando se aplica el campo magnético ( $B_0$ ), unos se orientan en la misma dirección del campo (núcleos con espín positivo, estado de espín  $\alpha$ ), y otros en dirección opuesta al campo (núcleos con espín negativo que están en un estado de mayor energía, estado de espín  $\beta$ ) (Friebolin, 2005). Por lo tanto, se creará una diferencia poblacional entre dos estados de energía (Figura 1).

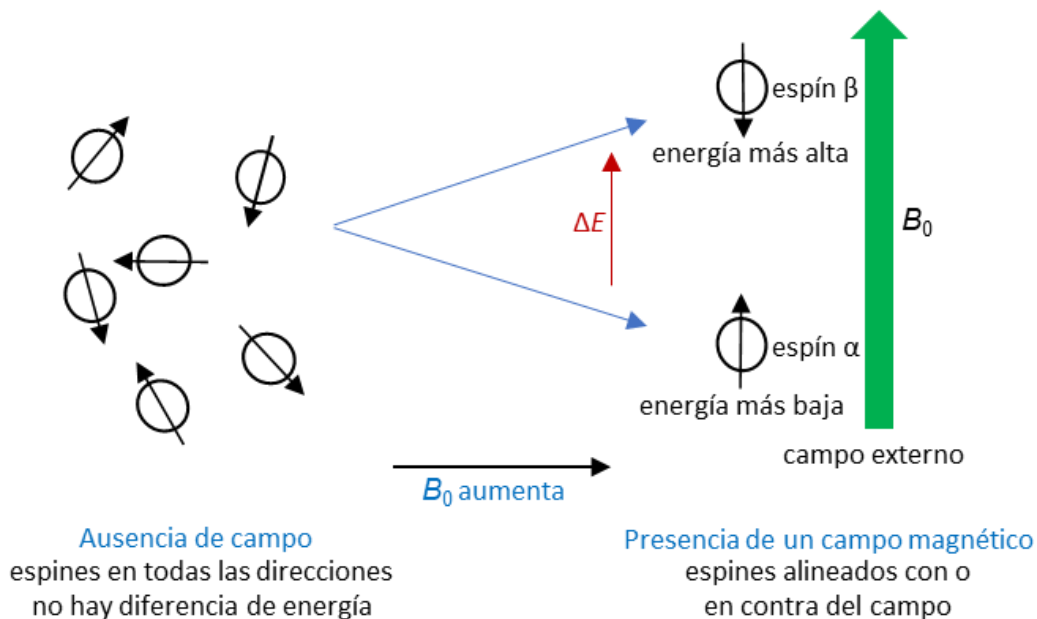


Figura 1. Esquema de los estados de espín de los núcleos.

Al estar alineados con el  $B_0$ , los espines nucleares describen un movimiento de precisión a una frecuencia proporcional al campo aplicado, esto se llama frecuencia de Larmor y es específica para cada tipo de núcleo. Si se aplica un pulso de radiofrecuencia con una duración y frecuencia similar a la frecuencia de Larmor, se originará una diferencia de energía ( $\Delta E$ ) proveniente de la perturbación del equilibrio de los estados  $\alpha$  y  $\beta$  de los espines nucleares. Posteriormente, al suspender dicho pulso los espines regresan a su estado de equilibrio y emiten una señal. Esta respuesta a la transición entre los estados energéticos por la absorción de energía de los núcleos atómicos será detectada, amplificada y registrada en una línea espectral o señal de resonancia (que es el espectro de RMN).

#### 4.3.1 Espectros de RMN monodimensionales

Los espectros de RMN proporcionan información estructural característica para cada metabolito que se encuentre presente en la muestra. Una de las espectroscopías que da más información y facilita la deducción estructural, es la Resonancia Magnética Nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN). Dentro de estos espectros unidimensionales de RMN se encuentra la propiedad del **desplazamiento químico** ( $\delta$ ), la cual es la frecuencia en partes por millón (ppm) a

la que sale cada núcleo. Habrá una señal única para cada conjunto de núcleos magnéticamente diferentes y nos darán información sobre la composición de los grupos atómicos que conforman la molécula. Los distintos desplazamientos dependen del entorno químico, ya que se generan por el aumento o disminución de la densidad electrónica y los campos inducidos por los otros núcleos.

La **constante de acoplamiento** ( $J$ ) espín-espín, que se mide en Hz, se origina cuando los espines magnéticos de dos tipos diferentes de protones interactúan. Cuando esta interacción ocurre, se dice que los protones están acoplados, por lo que esta constante proporciona información sobre átomos adyacentes. Las señales correspondientes a dos  $^1\text{H}$  acoplados se desdoblan con el mismo valor de  $J$ . A este desdoblamiento de señales se le conoce como **multiplicidad**, la cual da información sobre el número y disposición de núcleos próximos (Figura 2).

En un espectro de RMN **el área de las señales** es proporcional al número de núcleos que producen esa señal, siendo esta una propiedad cuantitativa de la RMN.

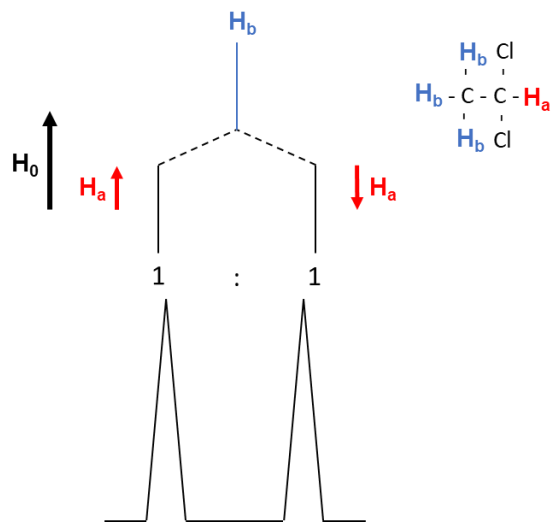


Figura 2. Desdoblamiento espín-espín de la señal del protón  $H_b$  causado por un protón vecino  $H_a$  (multiplicidad de doblete).



### 4.3.2 Espectros de RMN bidimensionales

La construcción de espectros bidimensionales en la RMN permite obtener correlaciones entre núcleos que se encuentren acoplados y así poder determinar las estructuras de moléculas complejas. Los espectros bidimensionales se dividen en homonucleares (correlaciones entre el mismo núcleo) y heteronucleares (correlaciones entre dos núcleos diferentes).

El experimento más usado para las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  es el COSY, por sus siglas en el inglés, *CO*rrelation *S*pectroscop*Y* (espectroscopía de correlación). Tiene tanto en la escala vertical como en la horizontal un espectro de  $^1\text{H}$ , y nos da información de los protones que están acoplados a 2, 3 y, en algunos casos 4 enlaces de distancia (Mitchell & Costisella, 2007). La magnitud de los acoplamientos está relacionada con la intensidad de las señales, en acoplamientos a 3 o 4 enlaces de distancia, la intensidad de las señales será baja. En el ejemplo de la Figura 3 se pueden observar las correlaciones a tres enlaces de distancia del protón  $\text{H}_a$  con  $\text{H}_b$  y viceversa,  $\text{H}_b$  con  $\text{H}_a$ . Asimismo, también se observan señales formando una diagonal, la cual es básicamente la proyección de un espectro unidimensional. Por lo tanto, las señales que se encuentren fuera de la diagonal serán las que nos indiquen las correlaciones entre los protones.

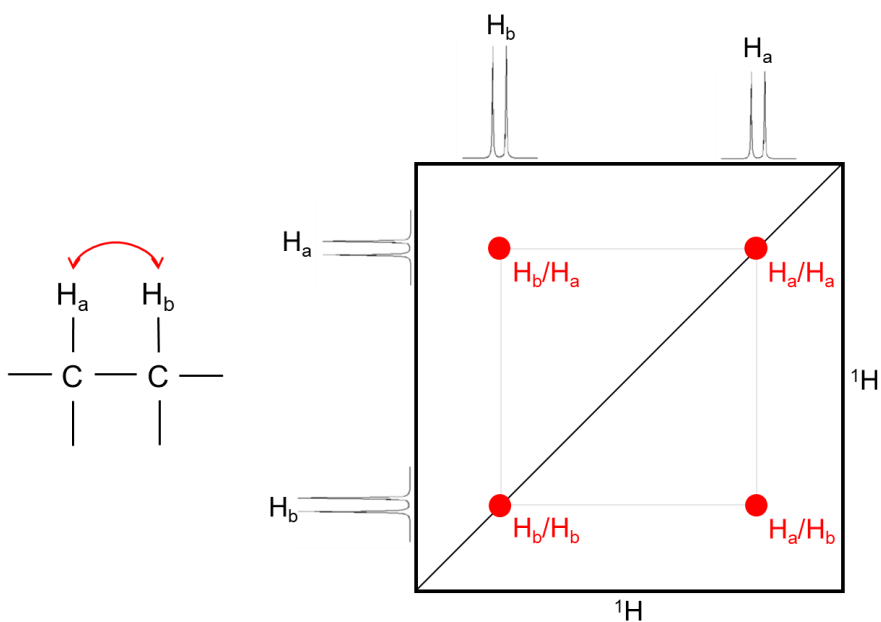


Figura 3. Ejemplo de espectro bidimensional COSY.

Un experimento que correlaciona  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a un enlace es la espectroscopía de coherencia heteronuclear cuántica simple o *Heteronuclear Single-Quantum Coherence* (HSQC por sus siglas en inglés), que en la escala horizontal tiene un espectro de  $^1\text{H}$  y en la vertical un espectro de  $^{13}\text{C}$ . Con el HSQC se pueden asignar todas las señales de protón y carbono, exceptuando los cuaternarios ya que no están unidos a un protón. Este experimento se puede adquirir en su versión editada para que los metinos y metilos salgan con fase positiva (rojo) y los metilenos con fase negativa (azul). Por lo tanto, la diferencia de colores de las señales nos da información sobre el grupo funcional al que pertenecen los núcleos. En la Figura 4 se encuentra un ejemplo de este tipo de espectro, donde se ven las correlaciones de  $\text{H}_a$  con  $\text{C}_a$  y  $\text{H}_b$  con  $\text{C}_b$ , los cuales están unidos directamente por un enlace de distancia.

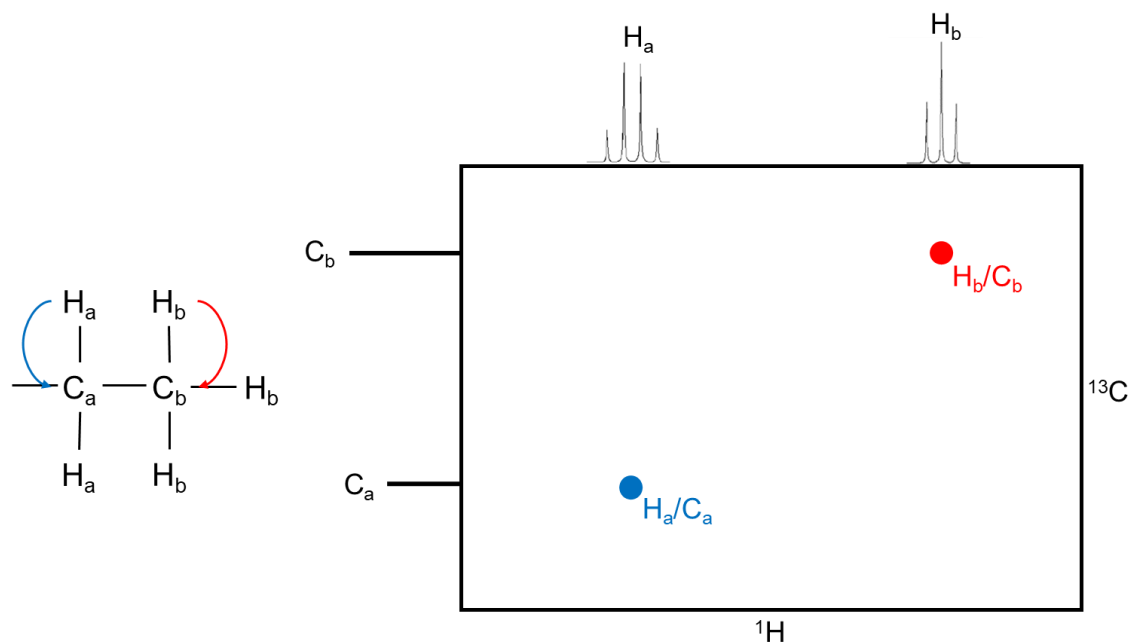


Figura 4. Ejemplo de espectro bidimensional HSQC en su versión editada, donde los metinos y metilos salen con fase positiva (rojo) y los metilenos con fase negativa (azul).

El espectro HMBC, por sus siglas en inglés, *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation* (espectroscopía de correlación heteronuclear de enlaces múltiples), es el experimento que correlaciona  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a través de 2, 3 y, algunas ocasiones en enlaces conjugados 4 enlaces de distancia. Tiene en la escala horizontal un espectro de  $^1\text{H}$  y en la vertical uno de  $^{13}\text{C}$ . En la Figura 5 se muestra un ejemplo

donde se observan las correlaciones de los protones  $H_a$ ,  $H_b$  y  $H_c$  con los carbonos  $C_a$ ,  $C_b$  y  $C_c$ . Como se puede observar, el protón  $H_a$  se correlaciona a dos enlaces de distancia con el  $C_b$  y a tres enlaces de distancia con el  $C_c$ , mientras que el protón  $H_c$  se correlaciona a dos enlaces de distancia con el  $C_b$  y a tres enlaces de distancia con el  $C_a$ . En el caso del protón  $H_b$ , hay correlación a dos enlaces de distancia con los carbonos  $C_a$  y  $C_c$ .

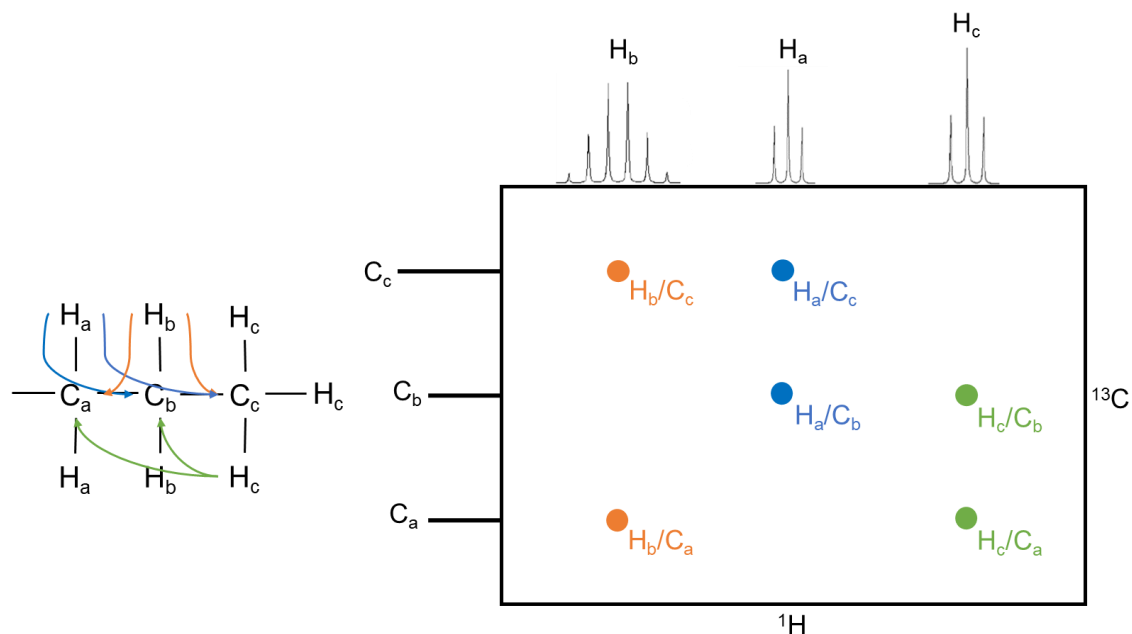


Figura 5. Ejemplo de espectro bidimensional HMBC. Los colores en este espectro son solo con fines didácticos.

Otro experimento es el HSQC-TOCSY, el cual combina dos experimentos; el HSQC (que obtiene correlaciones de acoplamiento heteronuclear) y el TOCSY (que obtiene correlaciones de acoplamiento homonuclear extendidas) (Facey, 2010). TOCSY, por sus siglas en inglés, *T*otal *C*orrelation *S*pectroscopY (espectroscopía de correlación total), como se muestra en la Figura 6, tiene en la escala horizontal un espectro de  $^1H$  y en la vertical un espectro de  $^{13}C$ . Este espectro nos da información sobre los distintos sistemas de cadenas de espín que se encuentren presentes en una molécula. En el ejemplo de la Figura 6 se pueden ver dos diferentes sistemas de espín que se encuentran adyacentes un grupo funcional "X". En la Figura 5, las señales de color naranja pertenecen al sistema de espín  $H_a$  y  $H_b$

que tienen correlaciones con los carbonos  $C_a$  y  $C_b$ . Mientras que las señales de color rosa pertenecen al sistema de espín de protones  $H_c$  y  $H_d$ , los cuales tienen correlaciones con los carbonos  $C_c$  y  $C_d$ .

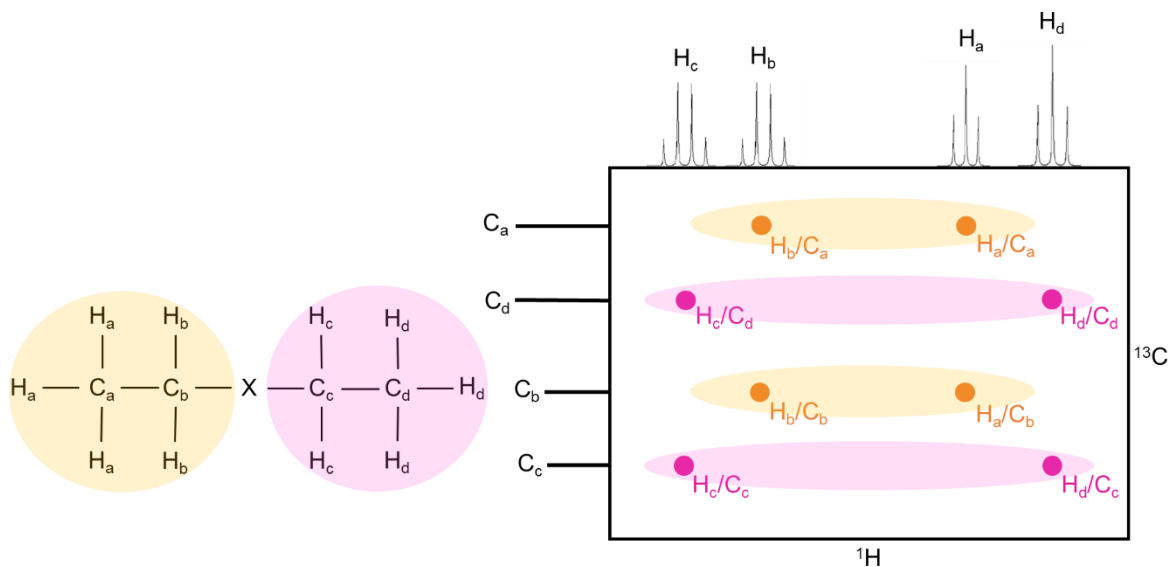


Figura 6. Ejemplo de espectro bidimensional HSQC-TOCSY, los diferentes sistemas de espín se identifican por los colores rosa y naranja.

#### 4.4 Estudios del vino mediante metabolómica por RMN

El perfil metabolómico de los vinos obtenido por RMN se puede utilizar para agrupar y comparar muestras de vinos (Viskić et al., 2021). En estos casos se requieren análisis con herramientas estadísticas que pueden ser no dirigidos, donde no se hace reconocimiento de metabolitos específicos, sino que se detectan los metabolitos en su conjunto, es un análisis sin hipótesis previa. También están los análisis metabolómicos dirigidos donde se tiene como objetivo lograr una detección y cuantificación de un grupo seleccionado de metabolitos (Ribbenstedt et al., 2018).

En los últimos años, la espectroscopía de RMN ha tenido un aumento de su aplicación en la ciencia de los alimentos y la agricultura, incluidos el control de calidad, la autenticación y el análisis de productos. El avance principal en el análisis de vinos es que ofrece una forma rápida de obtener la composición química de la uva, jugo de uva, mosto y vino, e identifica una gran variedad de compuestos

orgánicos menores (Amargianitaki & Spyros, 2017). También permite la discriminación por origen geográfico, vendimia o variedad de uva (Ehlers et al., 2022; Mascellani et al., 2021). La RMN se puede utilizar para detectar y cuantificar los compuestos mayoritarios en el vino: azúcares, aminoácidos, ácido láctico, ácido acético, etc. La cuantificación se logra debido a que las señales son directamente proporcionales al número de núcleos que le dan origen.

#### **4.4.1 Ventajas de la RMN**

La  $^1\text{H}$ -RMN es un método analítico ampliamente usado debido a su robustez, es rápido y la preparación de muestra es muy simple, y esta puede ser automatizada. Es un método no destructivo, por lo que se pueden realizar varios análisis con la misma muestra e incluso esta es posible de recuperar y almacenarse para analizar después de un periodo de tiempo. Además, es una técnica cuantitativa, ya que la intensidad de las señales es directamente proporcional a las concentraciones de los metabólicos y al número de núcleos que producen la señal. Permite que todos los metabolitos que se encuentren en un nivel de concentración detectable puedan ser observados en una sola medición. Los estudios de metabolómica pueden ser usados para análisis dirigidos y no dirigidos, aunque suele ser más común en análisis no dirigidos que no requieren de una hipótesis de trabajo previa (Emwas et al., 2019).

#### **4.4.2 Limitaciones de la RMN**

La principal limitación que tiene la  $^1\text{H}$ -RMN es su baja sensibilidad, en comparación con otros métodos como la EM. Sin embargo, gracias a los avances instrumentales en los últimos años, la sensibilidad se ha mejorado mediante la utilización de criosondas (sondas enfriadas con helio líquido) que mejoran la relación señal/ruido, con la aplicación de nuevas secuencias de pulsos, con múltiples scans (tiempo), ocupando un campo magnético de mayor intensidad o con métodos de hiperpolarización (Emwas et al., 2019).

#### 4.4.3 Extracción con cloroformo

En la metabolómica se busca analizar todos los metabolitos posibles en las muestras, de preferencia con la menor manipulación posible. Para lograr identificar un mayor número de metabolitos se pueden usar diferentes métodos de extracción y/o concentración, usualmente aplicando diferentes combinaciones de solventes. La selectividad del solvente se puede definir dependiendo de la habilidad del solvente para disolver compuestos específicos cuando sus polaridades son similares (Mushtaq et al., 2014). Se tiene la posibilidad de realizar la extracción con diferentes disolventes, ya sean polares (agua, metanol, etc.) para extraer compuestos polares como carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos, o no polares (disolventes orgánicos como el cloroformo, éter, etc.) para extraer compuestos no polares como ácidos grasos y carotenoides. La combinación de los espectros de RMN obtenidos con disolventes de diferentes polaridades permite obtener un panorama más amplio sobre el número de metabolitos obtenidos en una muestra (Maulidiani et al., 2018).

En el caso de querer observar metabolitos de moderada polaridad, no polares o hidrofóbicos, se pueden utilizar el cloroformo, el cual tiene un valor de polaridad ( $P^*$ ) de 4.4 en comparación con el agua que tiene un valor de 9 (Mushtaq et al., 2014).

## **5 METODOLOGÍA**

### **5.1 Muestras**

Se estudió una muestra de vino tinto de uva Malbec, proveniente de la vinícola Santa Elena, añada 2021, del valle “La Esperanza” del Estado de Aguascalientes, producido por el espacio educativo “Centro de Valor”. Adicionalmente, se analizó un “pool” de vinos de 40 muestras de vinos tintos mexicanos monovarietales (Touriga Nacional, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Marselán, Tempranillo, Grenache, Merlot, Syrah, Malbec, Pinot Noir, Salvador y Nebbiolo). Para hacer este “pool” se tomó 1 mL de cada una de las muestras y se mezclaron. La información completa de las muestras del “pool” se encuentra en el Anexo I.

### **5.2 Extracción con cloroformo deuterado**

Se evaluaron dos proporciones de vino:disolvente (4:1 y 14:1) con el objetivo de encontrar la proporción más adecuada para optimizar el proceso de extracción de metabolitos en  $\text{CDCl}_3$ . En el Anexo II se encuentran la comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN con dichas proporciones. Ambos espectros se realizaron en un espectrómetro de 700 MHz a 298 K. No se observó una diferencia significativa entre las intensidades de los metabolitos en ambos espectros, por lo que para este trabajo se decidió a utilizar la proporción más baja de 4:1.

Se tomaron 4 mL de cada una de las muestras de vino, los cuales se extrajeron con 1 mL de  $\text{CDCl}_3$  (99.8%, Cambridge Isotope Laboratories, USA) en un matraz volumétrico de 5 mL y se agitaron manualmente durante 5 s aproximadamente. Posteriormente se dejaron reposar durante 15 minutos hasta que las fases se separaran. Este procedimiento se realizó por triplicado tanto para la muestra de Malbec como para la mezcla de vinos.

## 5.3 Resonancia Magnética Nuclear

### 5.3.1 Preparación de muestras

Ya que se tuvieron las fases separadas, con una pipeta Pasteur se transfirieron 600  $\mu\text{L}$  de la fase orgánica a tubos para RMN de 5 mm de diámetro.

### 5.3.2 Equipo

Se adquirieron los espectros con un espectrómetro Avance III HD 700 operando a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 699.95 MHz y de  $^{13}\text{C}$  de 175 MHz (Bruker, Billerica, MA, USA), equipado con una sonda criogénica TCI con bobina de gradientes en el eje Z para tubos de 5 mm.

### 5.3.3 Adquisición de los espectros

Los experimentos de RMN se adquirieron usando secuencias de pulsos estándar de la librería de Bruker a 298.15 K. En la Tabla 2 se mencionan las condiciones aplicadas en los espectros uni- y bi-dimensionales.

Tabla 2. Experimentos de RMN.

	$^1\text{H}$ -RMN	$^{13}\text{C}$ -RMN	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC	$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC	HSQC-TOCSY
Secuencia de pulso	zg30	zgpg30	cosygpmfpp qf	hsqcedetgp sisp2.3	hmbcetgp1 3nd	hsqcdietgpsisp. 2
Ancho de ventana	7,704.16 Hz	42,614 Hz	6,024 Hz (F1) y 6,024 Hz (F2)	29,923 Hz (F1) y 6,024 Hz (F2)	42,245 Hz (F1) y 6,024 Hz (F2)	29,042 Hz (F1) y 11,160 Hz (F2)
Tiempo de relajación	2 s	2 s	0.81 s	0.91 s	0.91 s	2 s
Tiempo de adquisición	4.25 s	1.01 s	0.68 s	0.34 s	0.33 s	0.09 s
Número de puntos de datos	64 K	86 K	8 K x 256 (t2 x t1)	4 K x 256 (t2 x t1)	42 K x 512 (t2 x t1)	2 K x 256 (t2 x t1)
Número de transientes	32		16 por incremento	32 por incremento	64 por incremento	32 por incremento
Otros				$^1\text{J}_{\text{CH}}$ 145.0 Hz	Largo alcance $^n\text{J}_{\text{CH}}$ 8.0 Hz	$^1\text{J}_{\text{CH}}$ 145.0 Hz



### **5.3.4 Procesamiento de los espectros**

Los espectros se procesaron en el programa MestReNova (versión 12.0.0, Mestrelab Research S.L. 2017). Para los espectros unidimensionales de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, se corrigió la línea base y la fase de forma manual. A los espectros bidimensionales COSY y HMBC, se les ajustó automáticamente la línea base. A los espectros HSQC y HSQC-TOCSY se le corrigió manualmente la fase y la línea base. Los desplazamientos químicos se reportaron en ppm y todos los espectros fueron referenciados a la señal residual del disolvente deuterado ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{H}}= 7.26$  ppm,  $\delta_{\text{C}}=77.16$  ppm).

### **5.4 Identificación de metabolitos/Elucidación estructural**

La elucidación estructural de los metabolitos se realizó con la interpretación de los experimentos uni- y bi-dimensionales;  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC y HSQC-TOCSY. Mediante los espectros unidimensionales se realizó el análisis del desplazamiento químico, la multiplicidad, la integración y las constantes de acoplamiento, para cada señal.

Para verificar la identificación de los compuestos, se compararon los datos de RMN de las estructuras elucidadas con datos bibliográficos de la base de datos SDBS (Spectral Database for Organic Compounds).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se analizó el espectro  $^1\text{H}$ -RMN del extracto con  $\text{CDCl}_3$  de la muestra de vino tinto Malbec y posteriormente, se llevó a cabo la elucidación estructural de los metabolitos con ayuda de los espectros en 2D.

Se realizó el análisis comparativo del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del “pool” y de la muestra de vino Malbec, con la finalidad de ver la posibilidad de encontrar otros metabolitos no presentes en la muestra de Malbec.

Los espectros unidimensionales ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y bidimensionales (HSQC, COSY, HMBC Y HSQC-TOCSY) de la muestra de Malbec y del “pool”, se encuentran al final del trabajo en el Anexo III Malbec y en el Anexo IV “pool”.

### 6.1 Espectro de protón del vino tinto Malbec

En la Figura 7 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la extracción con  $\text{CDCl}_3$  de la muestra de vino tinto Malbec. En el inciso A el espectro se ajustó al pico de compuesto más alto, mientras que en el inciso B se aumentó la intensidad del espectro para poder distinguir las señales de menor intensidad. Se puede observar un gran número de señales con diferentes intensidades y multiplicidades, que corresponden a metabolitos con distintos grupos funcionales: los carbohidratos ( $\delta^1\text{H}$  3 a 5.5 ppm), los ácidos orgánicos ( $\delta^1\text{H}$  1.5-2.5 ppm) y los compuestos aromáticos ( $\delta^1\text{H}$  6 a 9 ppm).

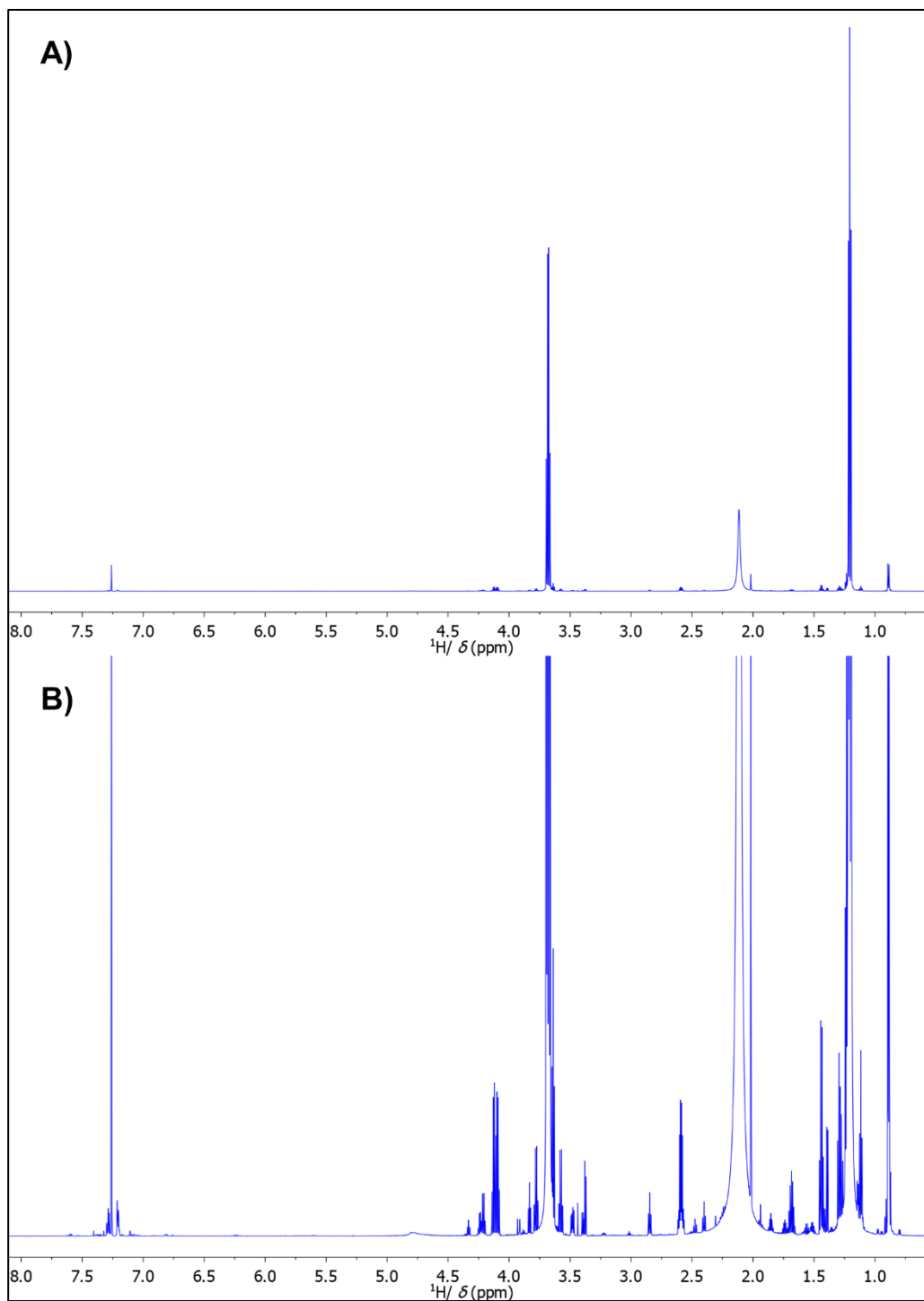


Figura 7. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del extracto del vino tinto Malbec  
A) espectro ajustado al pico de compuesto más alto, y B) mismo espectro con mayor aumento del eje y.

### 6.1.1 Elucidación estructural de los espectros uni- y bi-dimensionales

Para conocer las estructuras de los metabolitos presentes en el extracto de vino, se realizó una elucidación estructural mediante la interpretación de todos los espectros uni- y bi-dimensionales de RMN.

A continuación, se muestra paso a paso cómo se realizó la elucidación de uno de los metabolitos, el lactato de etilo (Figura 8). Este metabolito se seleccionó como ejemplo para mostrar paso a paso cómo se realiza la elucidación estructural, y se seleccionó debido a sus características estructurales, ya que tiene cuatro tipos de carbono diferentes; dos metilos (-CH<sub>3</sub>), un metileno (-CH<sub>2</sub>), un metino (-CH-) y un carbono cuaternario (-C-).

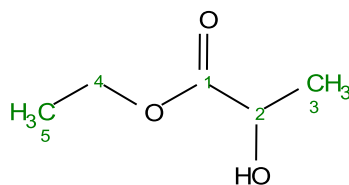


Figura 8. Estructura del lactato de etilo.

En la Figura 9 y Figura 10 se encuentran los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN, respectivamente, y en las siguientes figuras los experimentos bidimensionales: Figura 11 COSY, Figura 12 HSQC, Figura 13 HMBC y Figura 14 HSQC-TOCSY. Todos los espectros están asignados a la estructura del lactato de etilo.

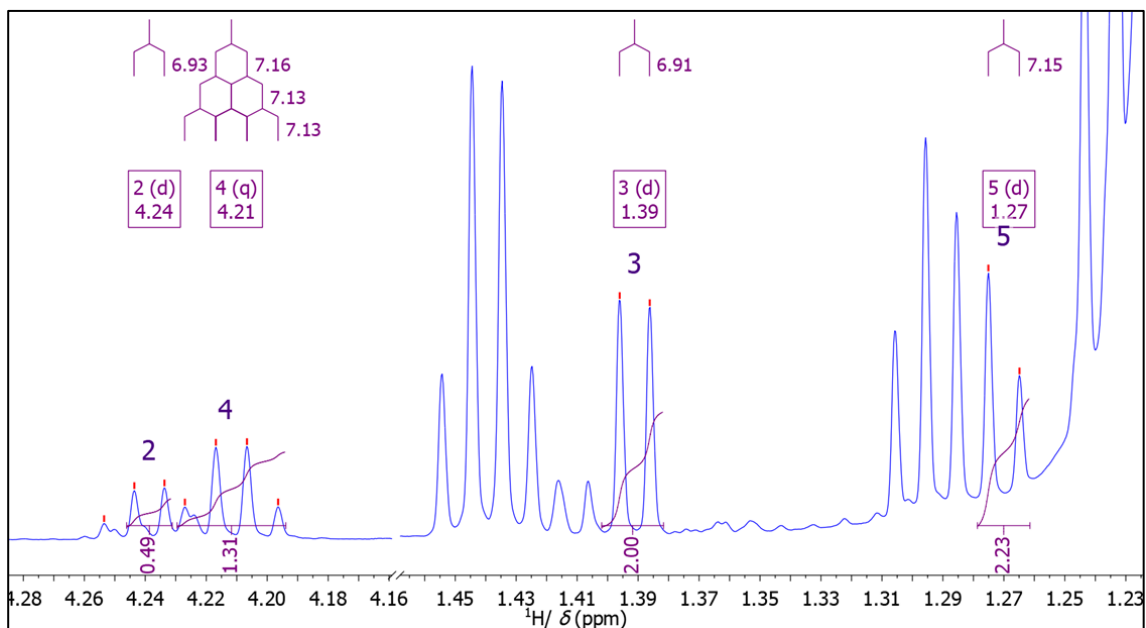


Figura 9. Ampliación del espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (1.23-1.46 y 4.16-4.18 ppm) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo. Se indican los valores de las integrales, las Js y el árbol de Js en color morado. Por solapamiento con otras señales, las asignaciones de H2 y H5 están marcadas con la letra “d” de doblete, en lugar de las letras “q” de cuarteto para H2 y “t” de triplete para H5.

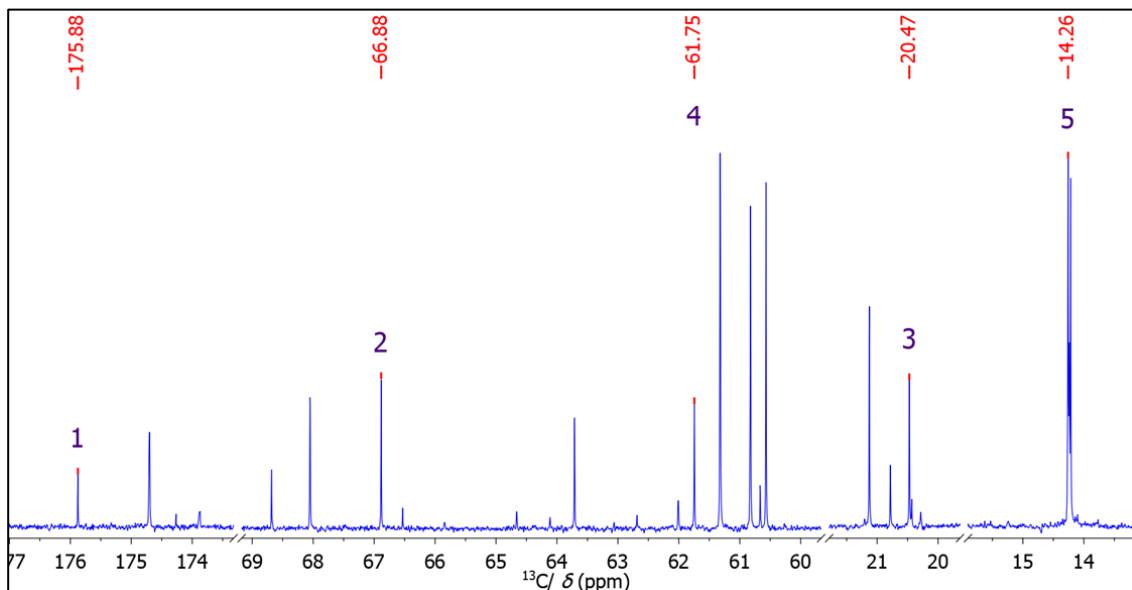


Figura 10. Ampliación del espectro de  $^{13}\text{C-RMN}$  (13.0-15.5, 20.0-21.5, 60.0-69.0 y 173.5-177.0 ppm) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo.

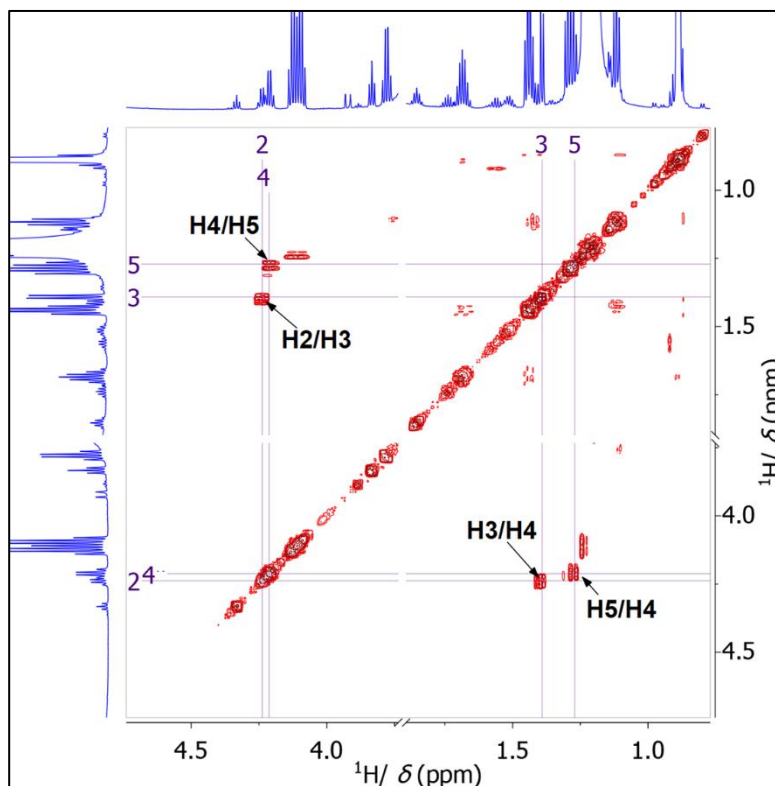


Figura 11. Ampliación del espectro COSY (0.8-1.9 y 3.7-4.7 ppm) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo.

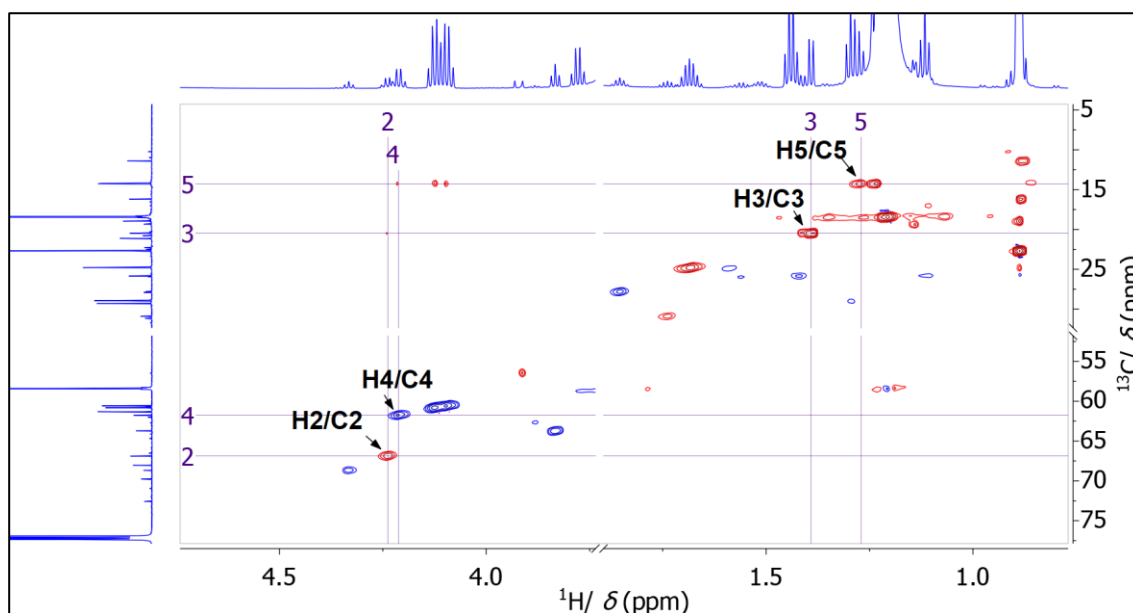


Figura 12. Ampliación del espectro HSQC ( $^1\text{H}$  de 0.8-1.9 y 3.7-4.7 ppm) ( $^{13}\text{C}$  de 4.3-30.5 y 51.7-77.9 ppm) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo.

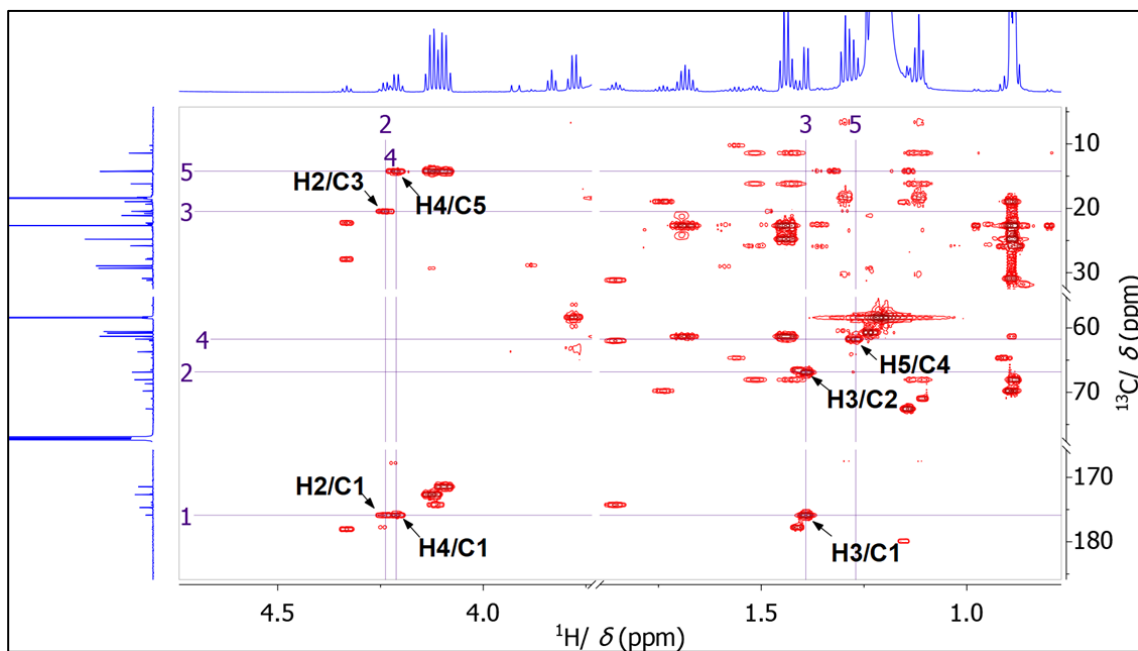


Figura 13. Ampliación de espectro bidimensional HMBC ( $^1\text{H}$  de 0.8-1.9 y 3.7-4.7 ppm) ( $^{13}\text{C}$  de 4.3-30.5, 51.7-77.9 y 165.8-185.9 ppm) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo.

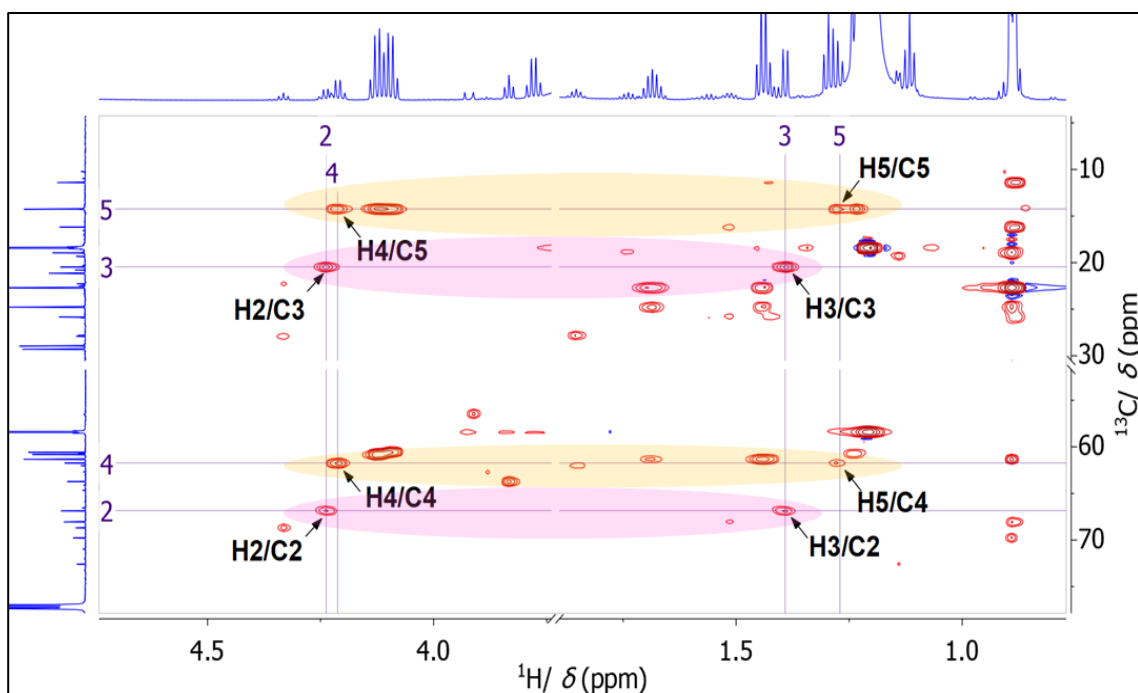


Figura 14. Ampliación de espectro bidimensional HSQC-TOCSY ( $^1\text{H}$  de 0.8-1.9 y 3.7-4.7 ppm) ( $^{13}\text{C}$  4.3-30.5 y 51.7-77.9 ppm) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo y con rosa y amarillo sus diferentes sistemas de espín.

Proceso de elucidación:

Se comenzó la elucidación con la señal doblete en  $\delta^1\text{H}$  1.39 ppm (asignada como H3) del espectro  $^1\text{H}$  (Figura 9) que, comparada con otras, es relativamente intensa, con multiplicidad clara y no está solapada. Por su desplazamiento químico debe corresponder a un metilo (H3), que en el espectro COSY (Figura 11) tiene correlación con el cuarteto en  $\delta^1\text{H}$  4.24 ppm, asignado como H2. Con esto se confirma que los protones de las asignaciones H3 y H2 pertenecen a la misma molécula, están acoplados a dos o tres enlaces de distancia y ya no tienen más acoplamientos con otros protones. Considerando que H2 es adyacente a un metilo debido a su multiplicidad de cuarteto, y H3 al ser un doblete es adyacente a un metino, se propone el fragmento de la Figura 15.

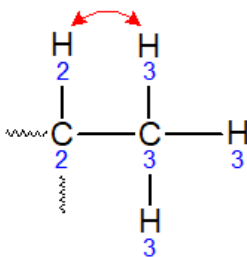


Figura 15. Fragmento de la estructura química de la molécula en proceso de elucidación, señalando con flechas las correlaciones observadas en el espectro COSY.

En el espectro HSQC (Figura 12) se encontraron las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a un enlace de distancia de los protones H2 y H3 con los carbonos C2 ( $\delta^{13}\text{C}$  66.88 ppm) y C3 ( $\delta^{13}\text{C}$  20.47 ppm), respectivamente. En este espectro las señales rojas correspondieron a metilos ( $-\text{CH}_3$ ) o metinos ( $-\text{CH}-$ ) y las señales azules a metilenos ( $-\text{CH}_2-$ ). De modo que, las señales de las correlaciones H2/C2 y H3/C3 al ser de color rojo confirman que el carbono C2 es un metino y el carbono C3 un metilo.

En el espectro HMBC (Figura 13) se buscaron las correlaciones de las señales de los protones H2 y H3 con carbonos a dos o tres enlaces de distancia. Se observó que H2 tiene correlación con C3 y con un carbono cuaternario C1 ( $\delta^{13}\text{C}$  175.88 ppm). H3 también tiene correlación con C2 y C1. En este punto se puede deducir que el carbono C1 está unido a C2 y considerando el desplazamiento químico de



C2 ( $\delta^{13}\text{C}$  66.88 ppm) y H2 ( $\delta^1\text{H}$  4.24 ppm), este debe estar unido a un hidroxilo (-OH). Esto se representa en la Figura 16.

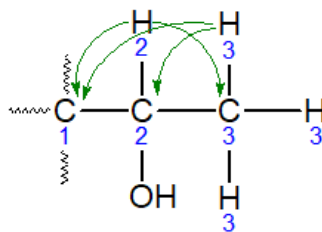


Figura 16. Fragmento de la estructura química de la molécula en proceso de elucidación, señalando con flechas las correlaciones observadas en el espectro HMBC.

En el espectro HMBC (Figura 13) se buscaron otros protones que pudieran correlacionar con C1 y se encontraron las correlaciones de la señal del cuarteto H4 ( $\delta^1\text{H}$  4.21 ppm) con C1 y con otro carbono en  $\delta^{13}\text{C}$  14.26 ppm, asignado como C5. En el HSQC (Figura 12) se buscó el valor del desplazamiento químico del carbono unido a H4 y se encontró que C4 tiene un  $\delta^{13}\text{C}$  de 61.74 ppm, correlación que es de color azul y por ende es un metileno (-CH<sub>2</sub>-). Mientras que la señal de la correlación H5/C5 es de color rojo y por tanto es un metilo (-CH<sub>3</sub>). Aunque H5 en el espectro de protón (Figura 9) se encuentra parcialmente solapado, H5 es un triplete y H4 un cuarteto, por lo que el fragmento elucidado hasta el momento se muestra en la Figura 17.

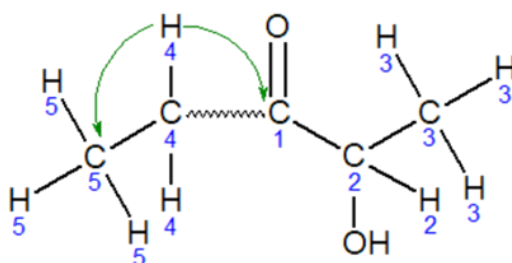


Figura 17. Fragmentos de la estructura química de la molécula en proceso de elucidación, señalando con flechas las correlaciones observadas en el espectro HMBC.

En el espectro COSY (Figura 11) se confirmó el acoplamiento de H4 con H5 ( $\delta^1\text{H}$  1.27 ppm) y de manera recíproca, de H5 con H4. Esta correlación se muestra en la Figura 18.

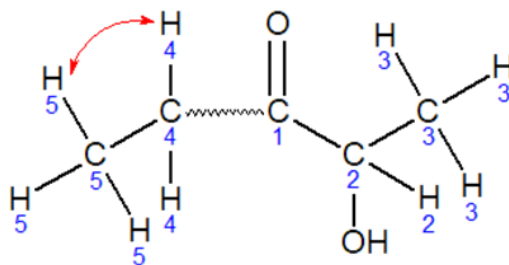


Figura 18. Fragmento de la estructura química de la molécula en proceso de elucidación, señalando con flechas las nuevas correlaciones observadas en el espectro COSY.

Hasta este paso, ya se tiene la estructura prácticamente de toda la cadena carbonada que conforma la molécula, se conocen todos los metinos, metilenos, metilos y carbonos cuaternarios. Con el espectro HSQC-TOCSY (Figura 14) se confirman los dos sistemas de espín previamente elucidados, uno conformado con H2/C2-H3/C3 y otro con H4/C4-H5/C5 (Figura 19).

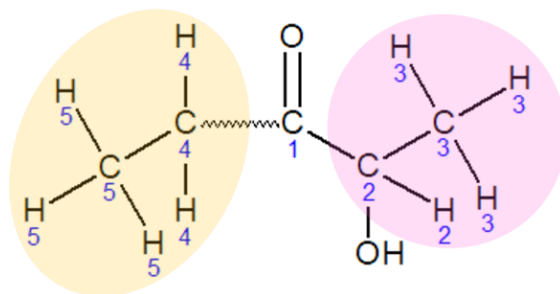


Figura 19. Estructura química de la molécula en proceso de elucidación, señalando con distintos colores los sistemas de espín observados en el espectro HSQC-TOCSY.

Dado que en el espectro HMBC (Figura 13) H5 no está correlacionado con C1, ni H2 se correlaciona con C4, se dedujo que hay un átomo aún desconocido entre C1 y C4. Analizando los desplazamientos químicos de H4 ( $\delta^1\text{H}$  4.21 ppm) y C4 ( $\delta^{13}\text{C}$  61.74 ppm), estos coinciden con los valores causados por la desprotección por un átomo de oxígeno, por lo que se concluye la unión de C4 a un oxígeno y, por lo tanto, la molécula se trata de un éster que en este caso es el lactato de etilo (Figura 20).

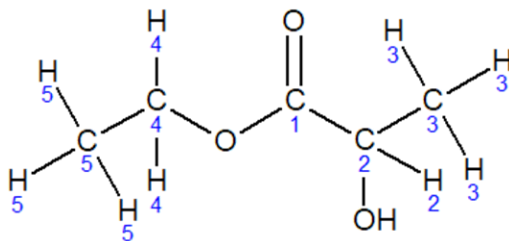


Figura 20. Estructura química del lactato de etilo encontrada mediante elucidación de los espectros de RMN.

En la Tabla 3 se encuentran los datos de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN experimentales y los reportados en la base de datos SDBS donde también se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Como se puede observar en la tabla, los datos son muy similares entre sí, por lo que apoya que la molécula elucidada es el lactato de etilo.

Tabla 3. Comparación de valores de  $\delta^1\text{H}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  del lactato de etilo de los espectros de RMN obtenidos experimentalmente contra los reportados en la base de datos SDBS.

ASIGNACIÓN	$\delta^1\text{H}$ (ppm)		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	
	EXPERIMENTAL	SDBS	EXPERIMENTAL	SDBS
1	-	-	175.88	175.75
2	4.24	4.28	66.88	66.88
3	1.39	1.41	20.47	20.38
4	4.21	4.23	61.74	61.52
5	1.27	1.30	14.26	14.21

## 6.2 Metabolitos identificados en la muestra de vino tinto Malbec

Siguiendo el proceso de elucidación descrito en la sección anterior, se lograron identificar trece compuestos, cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura 21. En la Figura 22 y en la Figura 23 se muestran los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la muestra de vino tinto con la identificación de las señales de los trece metabolitos. En el Anexo V se encuentran los espectros bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) de la muestra de vino tinto Malbec, en donde se muestran las correlaciones clave ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) que llevaron a la elucidación de cada uno de los trece metabolitos.

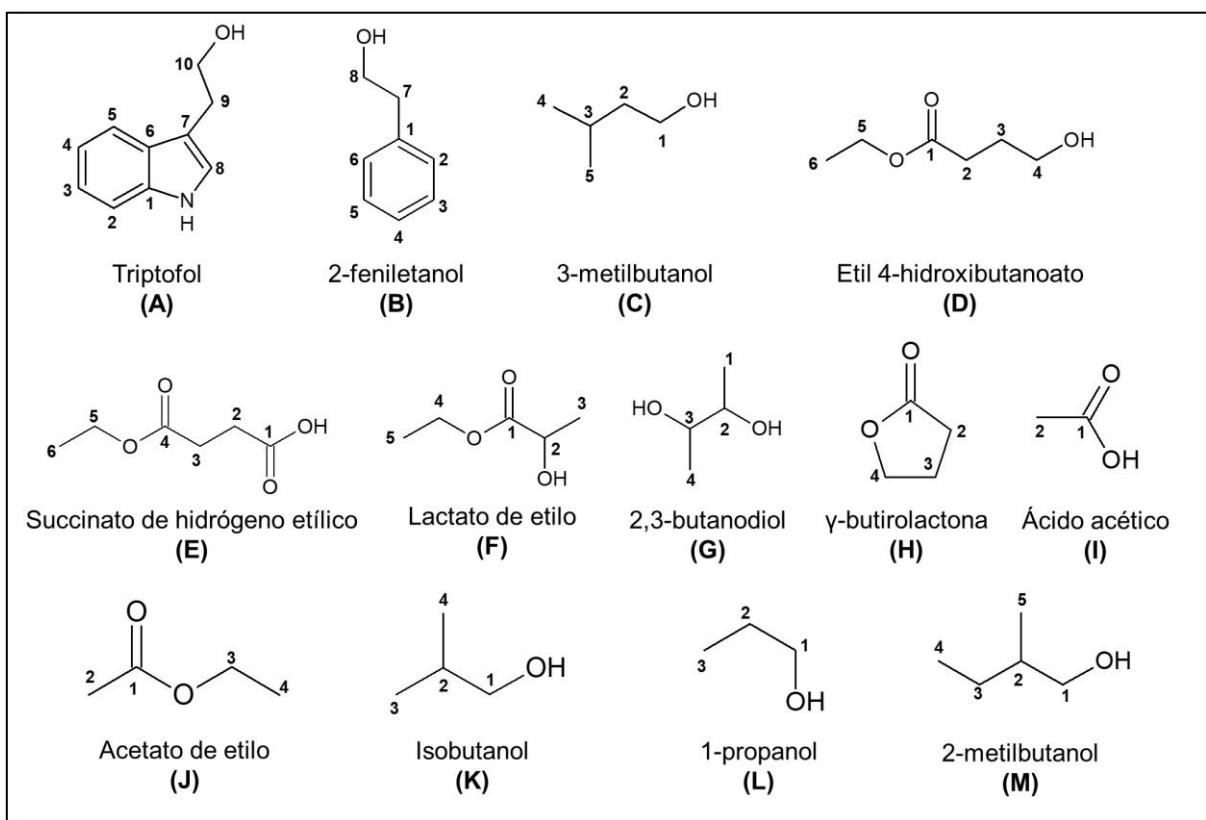


Figura 21. Compuestos identificados en el extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec. La numeración de las estructuras sigue las reglas de nomenclatura de la IUPAC.

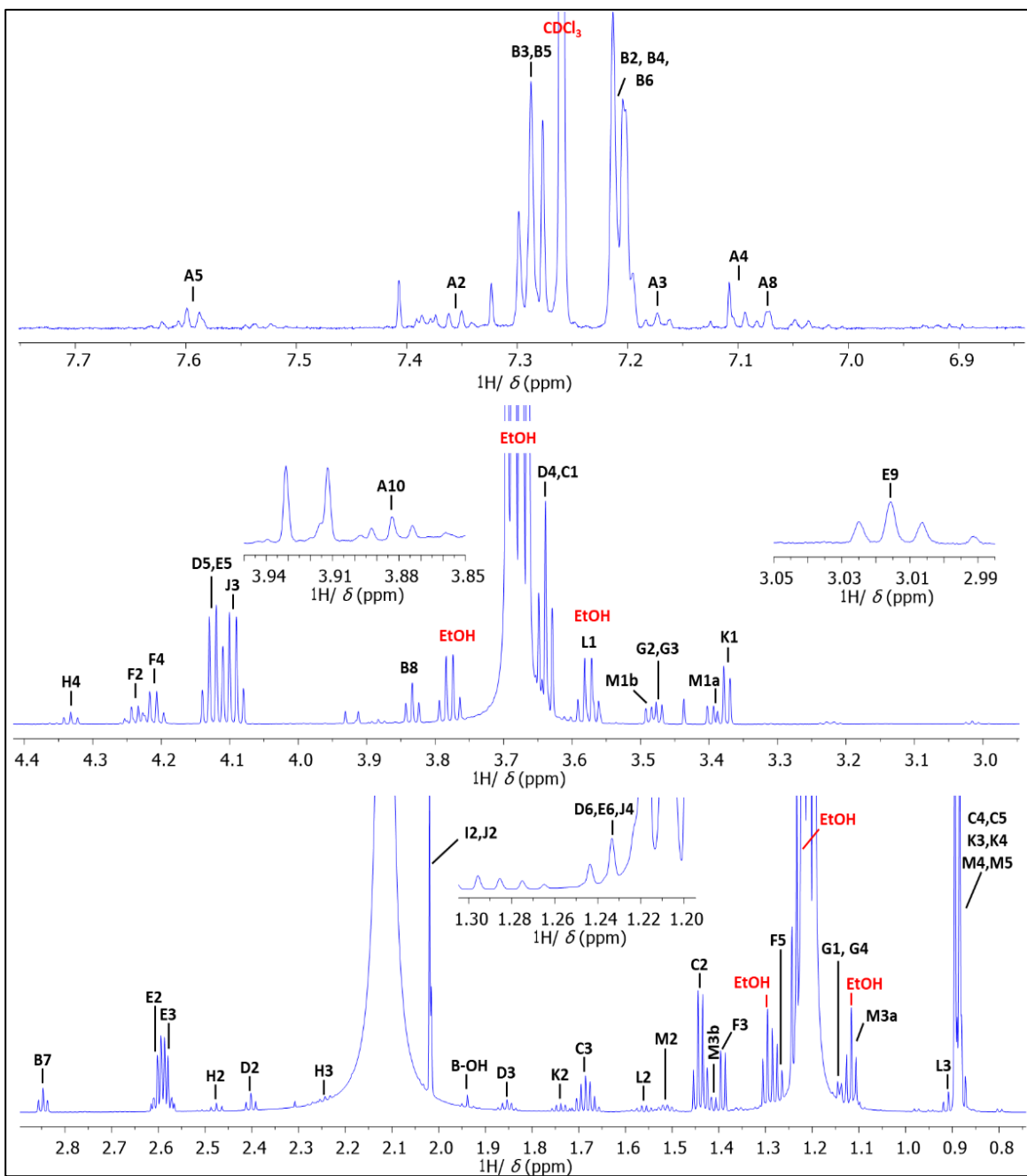


Figura 22. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del extracto del vino tinto Malbec con las asignaciones de los trece compuestos reportados en la Figura 21.

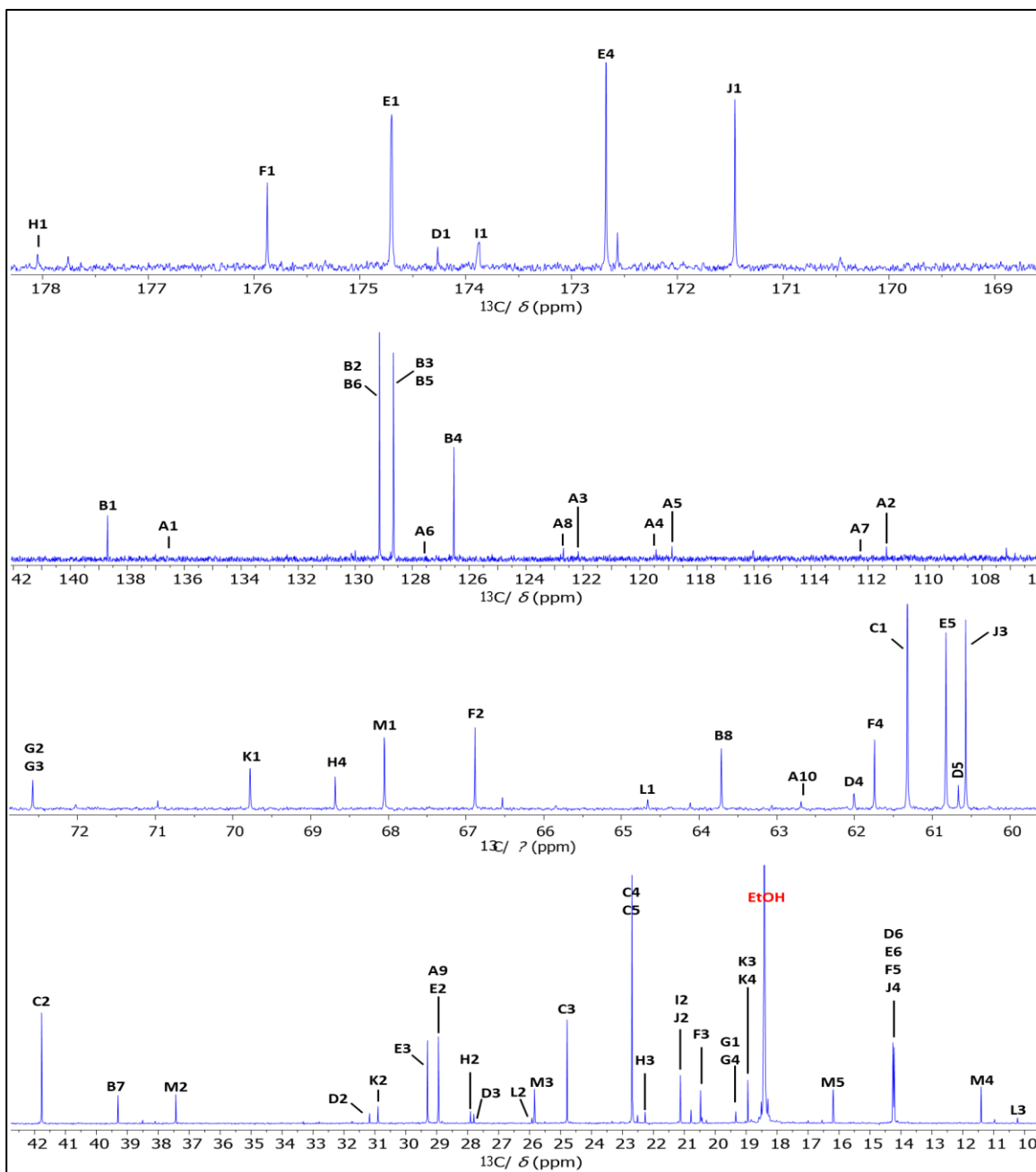


Figura 23. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del extracto del vino tinto Malbec con las asignaciones de los trece compuestos reportados en la Figura 21.

De la Tabla 4 a la Tabla 16 se muestran los valores de los desplazamientos químicos ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), las multiplicidades y los valores de las constantes de acoplamiento ( $J$ ), así como las correlaciones COSY, y las correlaciones HSQC y HMBC.

Tabla 4. Datos de RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del triptofol (A) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_{\text{H}}$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY	HMBC
1	-	136.60 (C)	-	-
2	7.36, d (8.1)	111.35 (CH)	H3	C4, C6
3	7.17, t (7.5)	122.17 (CH)	H2, H4	C1, C5
4	7.10, t (8.0)	119.44 (CH)	H3, H5	C2, C6
5	7.59, d (8.1)	118.88 (CH)	H4	C1, C3
6	-	127.56 (C)	-	-
7	-	112.29 (C)	-	-
8	7.07, br d (2.0)	122.69 (CH)	-	C1, C6, C7
9	3.02, t (6.5)	28.94 ( $\text{CH}_2$ )	H10	C6, C7, C8, C10
10	3.88, t (6.5)	62.69 ( $\text{CH}_2$ )	H9	C7, C9

Tabla 5. Datos de RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del 2-feniletanol (B) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_{\text{H}}$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY	HMBC
1	-	138.69 (C)	-	-
2,6	7.21, m*	129.15 (CH)	H3,5	C1, C2,6, C4, C7
3,5	7.29, t (7.8)	128.66 (CH)	H2,6, H4	C1, C3,5, C4
4	7.21, m*	126.53 (CH)	H3,5	C2,6
7	2.85, t (6.7)	39.30 ( $\text{CH}_2$ )	H8	C1, C2,6, C8
8	3.83, t (6.7)	63.71 ( $\text{CH}_2$ )	H7	C1, C7

\*señal solapada

Tabla 6. Datos de RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del 3-metilbutanol (C) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_{\text{H}}$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY	HMBC
1	3.64, t (6.9)	61.32 ( $\text{CH}_2$ )	H2	C2, C3
2	1.44, q (6.9)	41.77 ( $\text{CH}_2$ )	H1, H3	C1, C3, C4,5
3	1.69, n (6.8)	24.79 (CH)	H2, H4,5	C1, C2, C4,5
4,5	0.89, d (6.8)	22.69 ( $\text{CH}_3$ )	H3	C1, C2, C3, C4,5

Tabla 7. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del etil 4-hidroxi-butanoato (D) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	-	174.27 (C)	-	-
2	2.40, t (7.2)	31.17 (CH <sub>2</sub> )	H3	C1, C3, C4
3	1.85, p (6.6)	27.80 (CH <sub>2</sub> )	H2, H4	C1, C2, C4
4	3.64, t (6.9)	62.00 (CH <sub>2</sub> )	H3	C2, C3
5	4.13, q (7.2)	60.67 (CH <sub>2</sub> )	H6	C1, C6
6	1.24, t (7.2)	14.26 (CH <sub>3</sub> )	H5	C5

Tabla 8. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del succinato de hidrógeno etílico (E) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	-	174.7 (C)	-	-
2	2.60, m	28.95 (CH <sub>2</sub> )	H3	C1, C3, C4
3	2.58, m	29.30 (CH <sub>2</sub> )	H2	C1, C2, C4
4	-	172.67 (C)	-	-
5	4.13, q (7.1)	60.82 (CH <sub>2</sub> )	H6	C4, C6
6	1.24, t (7.2)	14.26 (CH <sub>3</sub> )	H5	C5

Tabla 9. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del lactato de etilo (F) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	-	175.88 (C)	-	-
2	4.24, q (6.9)	66.88 (CH)	H3	C1, C3
3	1.39, d (6.9)	20.47 (CH <sub>3</sub> )	H2	C1, C2
4	4.21, q (7.2)	61.74 (CH <sub>2</sub> )	H5	C1, C5
5	1.27, t (7.1)	14.26 (CH <sub>3</sub> )	H4	C4

Tabla 10. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del 2,3-butanodiol (G) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1,4	1.14, d (5.7)	19.33 (CH <sub>3</sub> )	H2,3	C1,4, C2,3
2,3	3.48, m*	72.58 (CH <sub>2</sub> )	H1,4	C1,4, C2,3

\*señal solapada

Tabla 11. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del  $\gamma$ -butirolactona (H) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	-	178.05 (C)	-	-
2	2.48, t (8.2)	27.91 (CH <sub>2</sub> )	H3	C1, C3, C4
3	2.24, m*	22.26 (CH <sub>2</sub> )	H2,H4	C1, C2, C4
4	4.33, t (7.1)	68.68 (CH <sub>2</sub> )	H3	C1, C2, C3

\*señal solapada



Tabla 12. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del ácido acético (I) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	-	173.87 (C)	-	-
2	2.02, s	21.13 (CH <sub>3</sub> )	-	C1

Tabla 13. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del acetato de etilo (J) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	-	171.46 (C)	-	-
2	2.02, s	21.13 (CH <sub>3</sub> )	-	C1, C3
3	4.10, q (7.1)	60.57 (CH <sub>2</sub> )	H4	C1, C4
4	1.24, t (7.2)	14.26 (CH <sub>3</sub> )	H3	C3

Tabla 14. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del isobutanol (K) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	3.37, d (6.5)	69.78 (CH <sub>2</sub> )	H2	C2, C3,4
2	1.73, m*	30.90 (CH)	H1, H3,4	C1, C3,4
3,4	0.89, d*	18.95 (CH <sub>3</sub> )	H2	C1, C2, C3,4

\*señal solapada

Tabla 15. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del 1-propanol (L) a 298 K en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1	3.57, m*	64.66 (CH <sub>2</sub> )	H2	C2, C3
2	1.56, m*	25.93 (CH <sub>2</sub> )	H1, H3	C1, C3
3	0.91, t* (7.4)	10.23 (CH <sub>3</sub> )	H2	C1, C2

\*señal solapada

Tabla 16. Datos de RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 298 K) del 2-metilbutanol (M) en el extracto de vino.

ASIGNACIÓN	$\delta_H$ , MULT., (J EN Hz)	$\delta_C$	COSY	HMBC
1a	3.39, d (4.0)	68.05 (CH <sub>2</sub> )	H1b, H2	C2, C3, C5
1b	3.47, d (6.0)		H1a, H2	C2, C3, C5
2	1.51, m	37.44 (CH)	H1a, H1b, H3a, H5	C1, C3, C4, C5
3a	1.12, m*	25.84 (CH <sub>2</sub> )	H2, H3b, H4	C1, C2, C4, C5
3b	1.42, m*		H2, H3a, H4	C1, C2, C4, C5
4	0.88, m*	11.41 (CH <sub>3</sub> )	H3a, H3b	C2, C3
5	0.89, d*	16.19 (CH <sub>3</sub> )	H2	C1, C2, C3

\*señal solapada

### 6.3 Comparación de espectros de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) Malbec y “pool”

En la Figura 24 se comparan los espectros unidimensionales de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra Malbec y del “pool” de vinos tintos para conocer si existen señales nuevas que correspondan a metabolitos que no se hayan encontrado en la muestra del vino Malbec. Como se observa, los espectros de ambas muestras son muy parecidos entre sí, sólo varía la intensidad de algunas señales. En la Figura 25, Figura 26 y Figura 27 se muestran diferentes regiones del espectro con las asignaciones de las señales de los trece metabolitos previamente identificados. En estas figuras se puede comprobar que los metabolitos identificados en la muestra de vino Malbec son los mismos que se encuentran presentes en la muestra del “pool”, por lo que cualitativamente poseen los mismos metabolitos. No obstante, la diferencia observada en la intensidad de algunas señales se traduce en una diferencia de concentración de ciertos metabolitos.

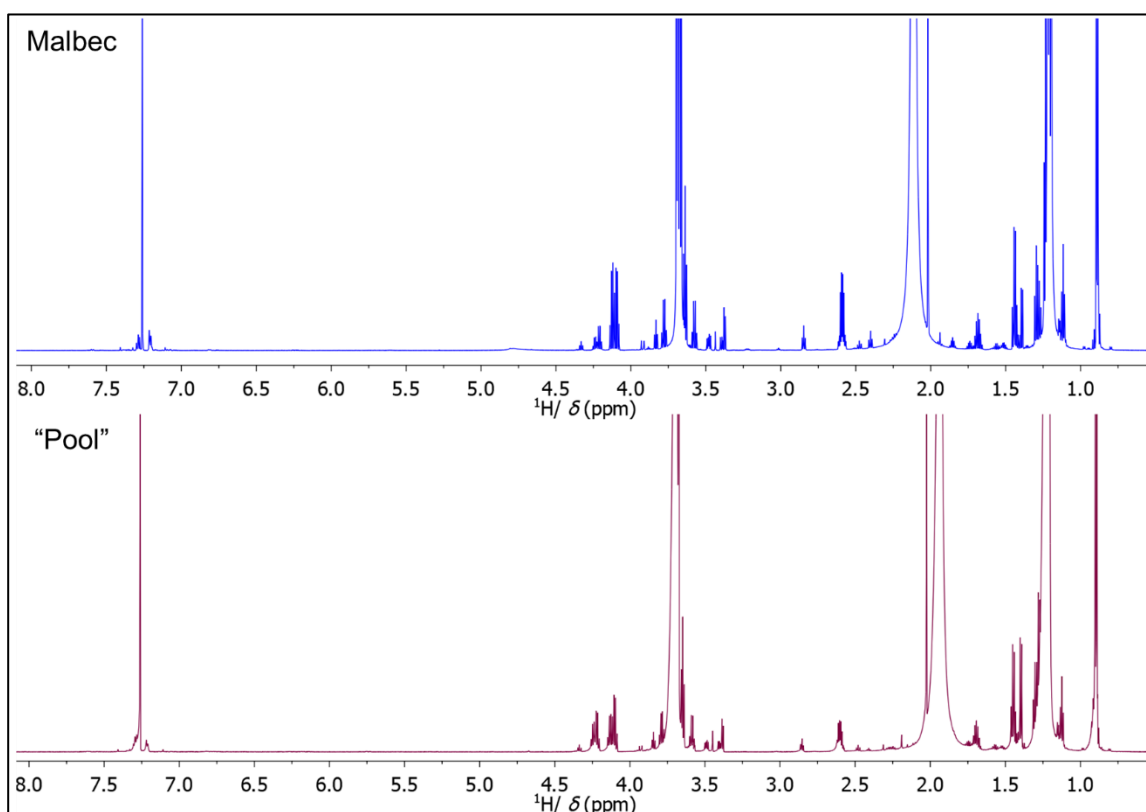


Figura 24. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) de los extractos de: la muestra de vino tinto Malbec (arriba) y del “pool” (abajo).

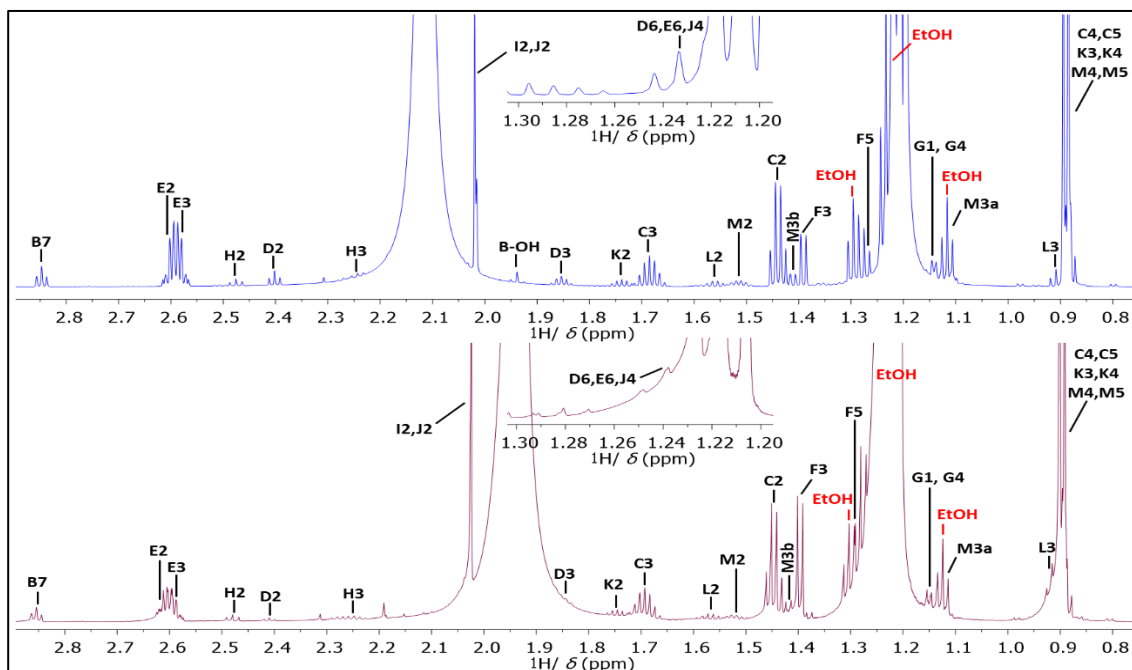


Figura 25. Ampliación (0.74-2.90 ppm) de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de  $\text{CDCl}_3$  de: la muestra de vino tinto Malbec (arriba) y del "pool" (abajo). Se muestran las asignaciones de los trece compuestos reportados en la Figura 21.

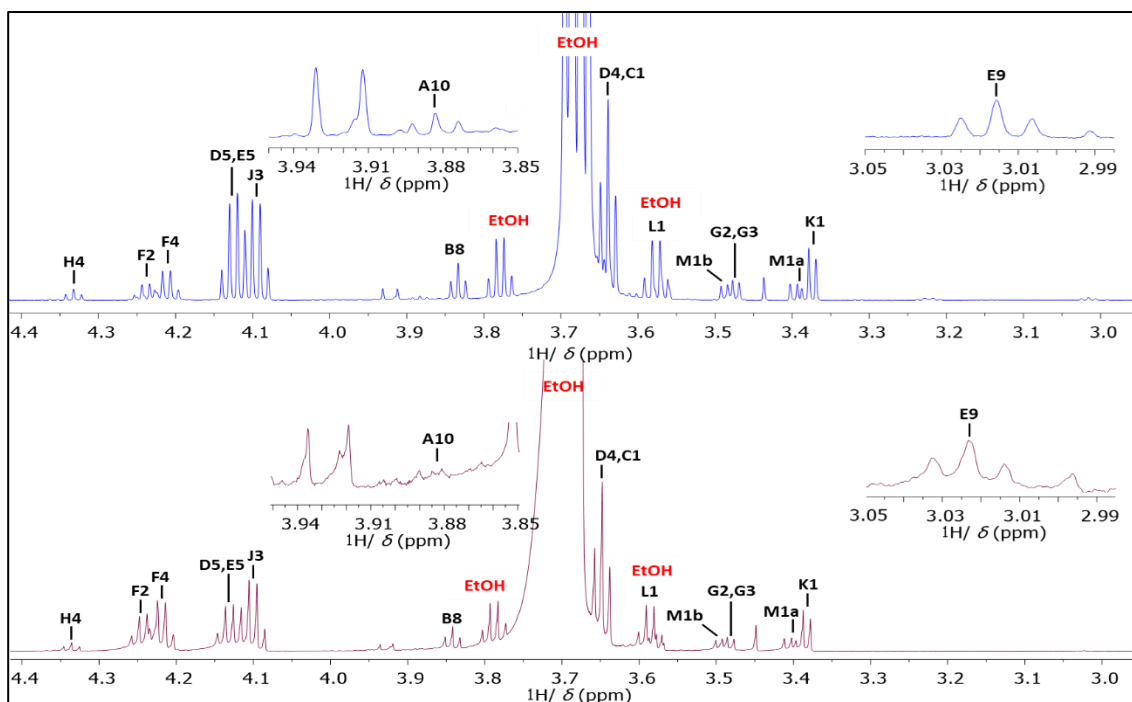


Figura 26. Ampliación (2.95-4.41 ppm) de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de  $\text{CDCl}_3$  de: la muestra de vino tinto Malbec (arriba) y del "pool" (abajo). Se muestran las asignaciones de los trece compuestos reportados en la Figura 21.

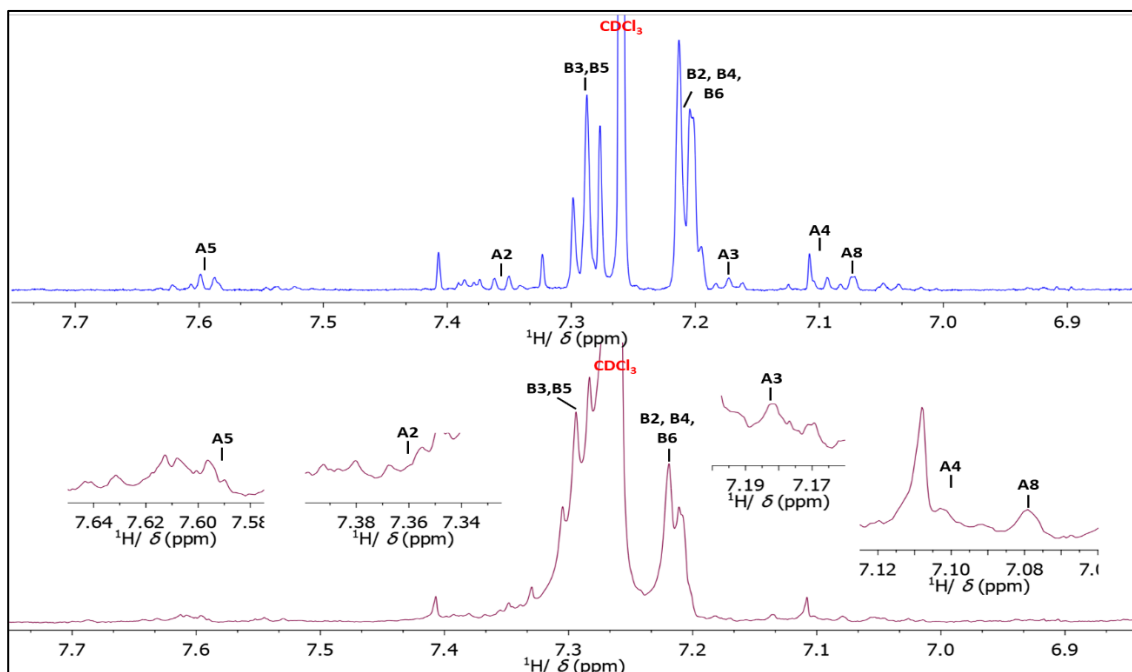


Figura 27. Ampliación (6.84-7.75 ppm) de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de  $\text{CDCl}_3$  de: la muestra de vino tinto Malbec (arriba) y del "pool" (abajo). Se muestran las asignaciones de los trece compuestos reportados en la Figura 21.

#### 6.4 Análisis de metabolitos

Para conocer la polaridad de los metabolitos identificados se buscó su coeficiente de partición ( $\log P$ ), el cual se utiliza para predecir la solubilidad en agua de las moléculas (Lemke et al., 2013). El coeficiente de partición de los metabolitos identificados, obtenidos de la página de PubChem, se presentan en la Tabla 17.

Tabla 17.  $\log P$  de cada uno de los metabolitos identificados.

METABOLITO IDENTIFICADO	$\log P$
(A) Triptofol	1.80
(B) 2-feniletanol	1.40
(C) 3-metilbutanol	1.16
(D) Etil 4-hidroxibutanoato	0.10
(E) Succinato de hidrógeno etílico	0.50
(F) Lactato de etilo	0.20
(G) 2,3-butanodiol	-0.90
(H) $\gamma$ -butirolactona	-0.60
(I) Ácido acético	-0.20
(J) Acetato de etilo	0.70
(K) Isobutanol	0.80
(L) 1-propanol	0.30
(M) 2-metilbutanol	1.20

El logP considera las propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas de cada uno de los grupos funcionales presentes en una molécula y asume que un compuesto es polar cuando su valor es igual o mayor que cinco (Lemke et al., 2013). En este caso, el logP de los metabolitos encontrados mediante la elucidación de los extractos de vinos con CDCl<sub>3</sub>, está comprendido entre -0.9 y 1.8, por lo que podemos considerar que todos estos compuestos presentan de baja a mediana polaridad.

Ocho de los trece metabolitos encontrados ya se habían reportado en estudios por <sup>1</sup>H-RMN en distintos tipos de vinos tintos. Estos compuestos son: 2-feniletanol (B) (Mascellani et al., 2021), succinato de hidrógeno etílico (E) (Ocaña-Rios et al., 2021), lactato de etilo (F) (Cassino et al., 2019), 2,3-butanodiol (G) (Son et al., 2009), ácido acético (I) (Lee et al., 2009), acetato de etilo (J), isobutanol (K) (Mascellani et al., 2021) y 1-propanol (L) (Gougeon et al., 2019). De estos compuestos, el 2-feniletanol, el 2,3-butanodiol y el Isobutanol, son alcoholes superiores (Ma et al., 2017).

Por otro lado, el triptofol, el 3-metilbutanol, el etil 4-hidroxibutanoato, la  $\gamma$ -butirolactona y el 2-metilbutanol es la primera vez que se reportan en vino tinto mediante la técnica de RMN. Sin embargo, sí han sido reportados mediante otras técnicas, a continuación, se mencionan algunos de estos estudios.

El triptofol (Figura 21 (A)), que se produce a partir del metabolismo de nitrógeno de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* por medio de la fermentación alcohólica de los mostos para producir vino (Mas et al., 2014), se analizó por cromatografía líquida de alta eficiencia o *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, por sus siglas en inglés) acoplada a EM. Se encontró que la temperatura, el grado alcohólico y la concentración de aminoácidos influyen en la formación del triptofol, tirosol, hidroxitirosol e histaminol (Bordiga et al., 2016).

El 3-metilbutanol (Figura 21 (C)), también conocido como alcohol isoamílico, es uno de los compuestos volátiles responsables del aroma del vino (Korenika et al., 2020). Se ha observado que las interacciones entre el alcohol isoamílico y las fracciones de derivados de antocianinas y/o de taninos en vinos tintos, están probablemente involucradas con estas características organolépticas (Sáenz-

Navajas et al., 2018), lo cual fue confirmado por Delgado y cols, mediante un análisis por cromatografía de gases acoplado a EM (GC/EM) (Delgado et al., 2022).

El etil 4-hidroxibutanoato (Figura 21 (D)) es un éster volátil producto de la fermentación de algunas cepas de levadura (Velázquez et al., 2016). Se han utilizado técnicas como GC/EM y con detector de ionización de llama FID (*Flame Ionization Detector*) y GC-Olfactometry con el objetivo de investigar la composición y propiedades sensoriales de vinos tintos de diferentes lugares; encontrando que el etil 4-hidroxibutanoato está asociado a olores frutales en vinos, como atributos de frutos rojos y algodón de azúcar (Darıcı & Cabaroglu, 2021).

La  $\gamma$ -butirolactona (Figura 21 (H)) es la principal lactona que se encuentra en el vino. Es un éster cíclico que se produce a través del metabolismo de las levaduras y bacterias ácido-lácticas y acéticas (Vose et al., 2001). Tiene una consistencia líquida, aceitosa e incolora, su olor es suave y agradable, además está posiblemente asociada con los descriptores de olor en el vino a leche/caramelo (Lytra et al., 2012). En un estudio realizado por Aleixandre y colaboradores, se identificó a la  $\gamma$ -butirolactona mediante CG como parte de las variables que permitieron la separación entre los vinos Cabernet Sauvignon, Monastrell, Tempranillo y Bobal (Aleixandre et al., 2002). Asimismo, mediante análisis cuantitativos por CG-EM-FID, se encontró a la  $\gamma$ -butirolactona como uno de unos compuestos aromáticos encontrados en mayor concentración en vinos realizados con *S. cerevisiae*, en comparación con otras cepas de levadura (Vigentini et al., 2016).

El 2-metilbutanol (Figura 21 (M)) es uno de los alcoholes superiores que se encuentra presente en el vino. Existen los dos isómeros enantiómeros (*R*) y (*S*) del 2-metilbutanol y ambos tienen sabor a malta, el cual se describe con las combinaciones de sabores dulces y a nueces y, con un sabor similar a tostado, caramelo, café o a frutas como las pasas. No obstante, sólo el (*S*)-2-metilbutanol se ha detectado en vinos. Se ha encontrado que su concentración es mayor en vinos tintos que en vinos blancos (Matheis et al., 2016). Por otra parte, se observó en un estudio por microextracción en fase sólida por headspace o *HeadSpace-Solid*

*Phase MicroExtraction* (HS-SPME, por sus siglas en inglés) acoplado a CG/EM, que el estado de maduración de las uvas con las que se elabora el vino está directamente relacionado con los niveles de algunos compuestos volátiles, incluyendo el 2-metilbutanol: a una maduración más prolongada, mayor será su concentración en las uvas (Rambla et al., 2016).

## 7 CONCLUSIONES

Mediante una extracción con  $\text{CDCl}_3$  se lograron identificar por RMN compuestos no polares y de polaridad intermedia en muestras de vino tinto. En total se extrajeron e identificaron trece metabolitos en una muestra de vino tinto Malbec y de un “pool” con 40 vinos tintos mexicanos monovarietales. Para identificar estos compuestos se realizó la elucidación estructural mediante el análisis de espectros uni- y bi-dimensionales de RMN.

Los mismos trece metabolitos fueron identificados tanto en la muestra del vino tinto Malbec, como la muestra del “pool” realizado con diferentes variedades de vino tinto.

Cinco de los metabolitos identificados: el triptofol, 3-metilbutanol, etil 4-hidroxi-butanoato, la  $\gamma$ -butirolactona y el 2-metilbutanol es la primera vez que se identifican mediante la técnica de  $^1\text{H}$ -RMN. Los otros metabolitos identificados: 2-feniletanol, succinato de hidrógeno etílico, lactato de etilo, 2,3-butanodiol, ácido acético, acetato de etilo, isobutanol y 1-propanol ya se habían identificado en diferentes estudios por esta técnica.

En este estudio, gracias a la extracción con  $\text{CDCl}_3$ , fue posible identificar cinco metabolitos que no habían sido reportados previamente mediante los estudios de RMN realizados directamente en vino con 10% de  $\text{D}_2\text{O}$  (agua deuterada), lo que puede contribuir a mejorar la caracterización de la huella metabolómica de los vinos con la técnica de RMN.



## 8 REFERENCIAS

1. Aleixandre, J. L., Lizama, V., Alvarez, I., & García, M. J. (2002). Varietal differentiation of red wines in the Valencian region (Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 751–755. <https://doi.org/10.1021/jf010712o>
2. Amargianitaki, M., & Spyros, A. (2017). NMR-based metabolomics in wine quality control and authentication. In *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* (Vol. 4, Issue 1). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0092-x>
3. Bordiga, M., Lorenzo, C., Pardo, F., Salinas, M. R., Travaglia, F., Arlorio, M., Coïsson, J. D., & Garde-Cerdán, T. (2016). Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. *Food Chemistry*, 197, 1038–1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.112>
4. Burdisso, P., Zoni, J., Raisa, R. M., & Vila, A. J. (2017). Metabolómica: Aplicaciones clave en salud y producción de alimentos. *Revista BCR*, 22–28.
5. Cassino, C., Tsolakis, C., Bonello, F., Gianotti, V., & Osella, D. (2019). Wine evolution during bottle aging, studied by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Food Research International*, 116, 566–577. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.075>
6. Darıcı, M., & Cabaroglu, T. (2021). Chemical and sensory characterization of Kalecik Karası wines produced from two different regions in Turkey using chemometrics. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16278>
7. Delgado, J. A., Sánchez-Palomo, E., Osorio Alises, M., & González Viñas, M. A. (2022). Chemical and sensory aroma typicity of La Mancha Petit Verdot wines. *LWT*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113418>
8. Ehlers, M., Horn, B., Raeke, J., Fauhl-Hassek, C., Hermann, A., Brockmeyer, J., & Riedl, J. (2022). Towards harmonization of non-

- targeted <sup>1</sup>H NMR spectroscopy-based wine authentication: Instrument comparison. *Food Control*, 132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108508>
9. Emwas, A. H., Roy, R., McKay, R. T., Tenori, L., Saccenti, E., Nagana Gowda, G. A., Raftery, D., Alahmari, F., Jaremko, L., Jaremko, M., & Wishart, D. S. (2019). Nmr spectroscopy for metabolomics research. In *Metabolites* (Vol. 9, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>
  10. Facey, G. (2010). *HSQC-TOCSY*. University of Ottawa NMR Facility Blog. <http://u-of-o-nmr-facility.blogspot.com/2010/07/hsqc-tocsy.html>
  11. Fehér, J., Lengyel, G., & Lugasi, A. (2007). The cultural history of wine - Theoretical background to wine therapy. In *Central European Journal of Medicine* (Vol. 2, Issue 4, pp. 379–391). <https://doi.org/10.2478/s11536-007-0048-9>
  12. Friebolin, H. (2005). *Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Vol. 6(6)* (4th ed.). Wiley-VCH.
  13. Gao, Y., Hou, L., Gao, J., Li, D., Tian, Z., Fan, B., Wang, F., & Li, S. (2021). Metabolomics approaches for the comprehensive evaluation of fermented foods: A review. In *Foods* (Vol. 10, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/foods10102294>
  14. Gougeon, L., da Costa, G., Richard, T., & Guyon, F. (2019). Wine authenticity by quantitative <sup>1</sup>H NMR versus multitechnique analysis: A case study. *Food Analytical Methods*, 12(4), 956–965. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-01425-z>
  15. Greco, G., Grosse, S., & Letzel, T. (2013). Serial coupling of reversed-phase and zwitterionic hydrophilic interaction LC/MS for the analysis of polar and nonpolar phenols in wine. *Journal of Separation Science*, 36(8), 1379–1388. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200920>
  16. Gürbüz, O., Rouseff, J., Talcott, S. T., & Rouseff, R. (2013). Identification of muscadine wine sulfur volatiles: Pectinase versus skin-

- contact maceration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 532–539. <https://doi.org/10.1021/jf304074m>
17. Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: A review. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>
18. Hidalgo-Togores, J. (2018). *Tratado de Enología: Vol. I* (3a ed.). Ediciones Mundi-Prensa. [https://books.google.com.mx/books/about/Tratado\\_de\\_Enolog%C3%ADa\\_Volumen\\_I\\_y\\_II.html?id=fQVzDwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=kp\\_read\\_button&hl=es&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books/about/Tratado_de_Enolog%C3%ADa_Volumen_I_y_II.html?id=fQVzDwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=kp_read_button&hl=es&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
19. Jiang, B., & Zhang, Z. (2010). Volatile compounds of young wines from cabernet sauvignon, cabernet gerschel and chardonnay varieties grown in the loess plateau region of China. *Molecules*, 15(12), 9184–9196. <https://doi.org/10.3390/molecules15129184>
20. Korenika, A. M. J., Preiner, D., Tomaz, I., & Jeromel, A. (2020). Volatile profile characterization of croatian commercial sparkling wines. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184349>
21. 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. <https://doi.org/10.1021/jf9028442>
22. Lemke, T., Williams, D., Roche, V., & Zito, W. (2013). *Foye's Principles of Medicinal chemistry* (7th ed.). Wolters Kluwe.
23. Liu, M., Zeng, Z., & Tian, Y. (2005). Elimination of matrix effects for headspace solid-phase microextraction of important volatile compounds in red wine using a novel coating. *Analytica Chimica Acta*, 540(2), 341–353. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.029>
24. Lytra, G., Tempere, S., Revel, G. de, & Barbe, J. C. (2012). Impact of perceptive interactions on red wine fruity aroma. *Journal of Agricultural*

- and Food Chemistry*, 60(50), 12260–12269.  
<https://doi.org/10.1021/jf302918q>
25. Ma, L., Huang, S., Du, L., Tang, P., & Xiao, D. (2017). Reduced Production of Higher Alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* in Red Wine Fermentation by Simultaneously Overexpressing BAT1 and Deleting BAT2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(32), 6936–6942. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01974>
26. Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2014). Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. In *BioMed Research International* (Vol. 2014). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>
27. Mascellani, A., Hoca, G., Babisz, M., Krska, P., Kloucek, P., & Havlik, J. (2021). <sup>1</sup>H NMR chemometric models for classification of Czech wine type and variety. *Food Chemistry*, 339. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127852>
28. Matheis, K., Granvogl, M., & Schieberle, P. (2016). Quantitation and Enantiomeric Ratios of Aroma Compounds Formed by an Ehrlich Degradation of l-Isoleucine in Fermented Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(3), 646–652. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05427>
29. Maulidiani, M., Mediani, A., Abas, F., Park, Y. S., Park, Y. K., Kim, Y. M., & Gorinstein, S. (2018). <sup>1</sup>H NMR and antioxidant profiles of polar and non-polar extracts of persimmon (*Diospyros kaki* L.) – Metabolomics study based on cultivars and origins. *Talanta*, 184, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.084>
30. Mazauric, J. P., & Salmon, J. M. (2006). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: II. Analysis of desorbed polyphenol compounds from yeast lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3876–3881. <https://doi.org/10.1021/jf060037o>

31. Mitchell, T. N., & Costisella, B. (2007). *NMR-From Spectra to Structures* (2nd ed.). Springer.
32. Mushtaq, M. Y., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Wilson, E. G. (2014). Extraction for metabolomics: Access to the metabolome. In *Phytochemical Analysis* (Vol. 25, Issue 4, pp. 291–306). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/pca.2505>
33. Nemzer, B., Kalita, D., Yashin, A. Y., & Yashin, Y. I. (2022). Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. In *Beverages* (Vol. 8, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/beverages8010001>
34. Ocaña-Rios, I., Ruiz-Terán, F., García-Aguilera, M. E., Tovar-Osorio, K., Rodríguez De San Miguel, E., & Esturau-Escofet, N. (2021). Comparison of two sample preparation methods for <sup>1</sup>H-NMR wine profiling: Direct analysis and solid-phase extraction. *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 60(2), 69–75. <https://doi.org/10.5073/vitis.2021.60.69-75>
35. Polášková, P., Herszage, J., & Ebeler, S. E. (2008). Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*, 37(11), 2478–2489. <https://doi.org/10.1039/b714455p>
36. Ralli, E., Amargianitaki, M., Manolopoulou, E., Misiak, M., Markakis, G., Tachtalidou, S., Kolesnikova, A., Dais, P., & Spyros, A. (2018). NMR spectroscopy protocols for food metabolomics applications. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1738, pp. 203–211). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7643-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7643-0_14)
37. Rambla, J. L., Trapero-Mozos, A., Diretto, G., Moraga, A. R., Granell, A., Gómez, L. G., & Ahrazem, O. (2016). Gene-metabolite networks of volatile metabolism in Airen and Tempranillo grape cultivars revealed a distinct mechanism of aroma bouquet production. *Frontiers in Plant Science*, 7(OCTOBER2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01619>

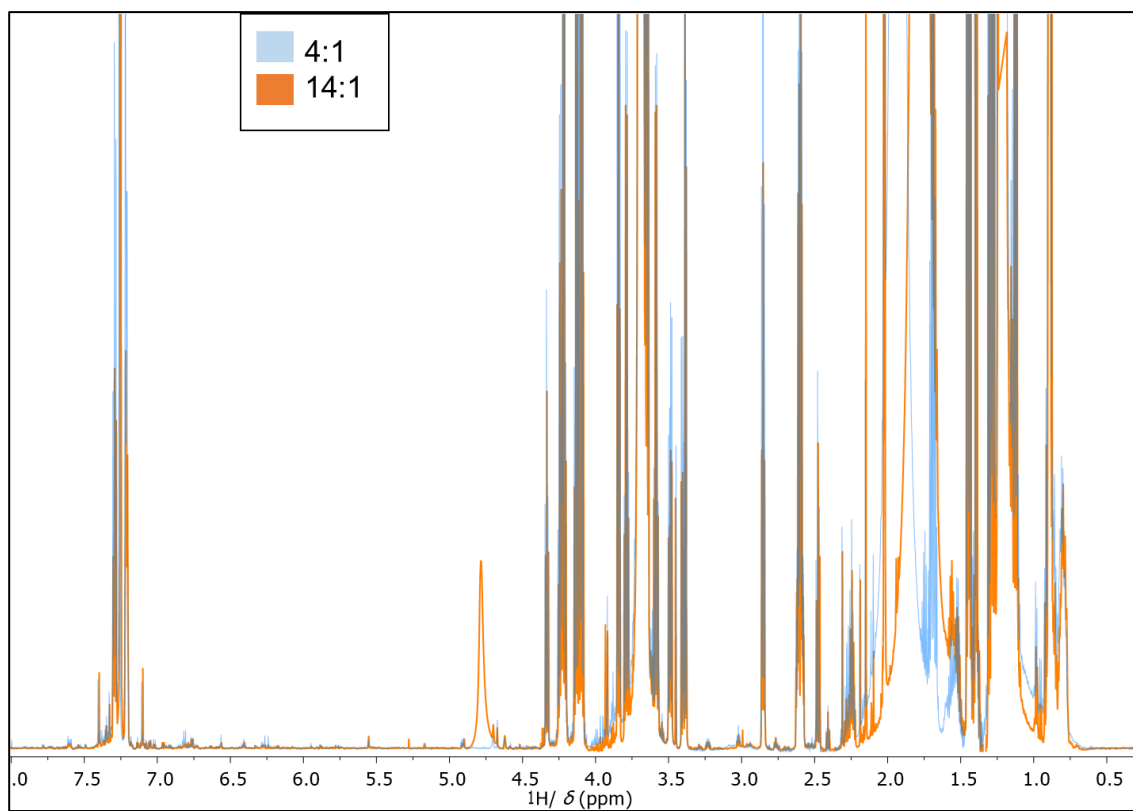
38. Ribbenstedt, A., Ziarrusta, H., & Benskin, J. P. (2018). Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLOS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207082>
39. Sáenz-Navajas, M. P., Arias, I., Ferrero-del-Teso, S., Fernández-Zurbano, P., Escudero, A., & Ferreira, V. (2018). Chemo-sensory approach for the identification of chemical compounds driving green character in red wines. *Food Research International*, 109, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.037>
40. Son, H. S., Hwang, G. S., Kim, K. M., Ahn, H. J., Park, W. M., van den Berg, F., Hong, Y. S., & Lee, C. H. (2009). Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using <sup>1</sup>H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1481–1490. <https://doi.org/10.1021/jf803388w>
41. Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M., Álvarez, M. L., & Ramírez, M. (2016). Using mixed inocula of *Saccharomyces cerevisiae* killer strains to improve the quality of traditional sparkling-wine. *Food Microbiology*, 59, 150–160. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.006>
42. Vigentini, I., Maghradze, D., Petrozziello, M., Bonello, F., Mezzapelle, V., Valdetara, F., Failla, O., & Foschino, R. (2016). Indigenous georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00352>
43. Viskić, M., Bandić, L. M., Korenika, A. M. J., & Jeromel, A. (2021). NMR in the service of wine differentiation. In *Foods* (Vol. 10, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10010120>
44. Vose, J., Tighe, T., Schawarts, M., & Buel, E. (2001). Detection of gamma-butyrolactone (GBL) as a natural component in wine. *Journal of Forensic Sciences*, 46, 1164–1167.
45. Yunoki, K., Tanji, M., Murakami, Y., Yasui, Y., Hirose, S., & Ohnishi, M. (2004). *Fatty Acid Compositions of Commercial Red Wines*.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Anexo I. Información de los vinos tintos del “pool”

CLAVE	CASA PRODUCTORA/ BODEGA	VARIEDAD DE UVA	AÑADA	OBTENCIÓN	VALLE	ESTADO
213	Freixenet	Touriga Nacional	2018	Freixenet	NA	Ags.
214	Freixenet	Touriga Nacional	2018	Freixenet	NA	Ags.
215	Freixenet	Cabernet Sauvignon	2019	Freixenet	Ezequiel Montes	Qro.
216	Freixenet	Cabernet Franc	2018	Freixenet	Colón	Qro.
217	Freixenet	Marselán	2020	Freixenet	Ezequiel Montes	Qro.
218	Freixenet	Grenache	2020	Freixenet	Ezequiel Montes	Qro.
219	Freixenet	Tempranillo	2020	Freixenet	NA	S.L.P.
220	Freixenet	Tempranillo	2020	Freixenet	Colón	Qro.
221	Freixenet	Tempranillo	2019	Freixenet	Mezcla	Qro.
222	Freixenet	Merlot	2020	Freixenet	Freixenet	Qro.
223	Freixenet	Merlot	2019	Freixenet	Mezcla	Qro.
224	Freixenet	Syrah	2019	Freixenet	Mezcla	Qro.
225	Freixenet	Cabernet Sauvignon	2019	Freixenet	Mezcla	Qro.
226	Freixenet	Merlot	2021	Freixenet	Mezcla	Qro.
229	Freixenet	Merlot	2021	Freixenet	NA	Ags.
230	Freixenet	Merlot	2021	Freixenet	Huimilpan	Qro.
233	Freixenet	Malbec	2021	Freixenet	NA	Ags./Gto.
234	Freixenet	Pinot Noir	2021	Freixenet	Freixenet	Qro.
240	Freixenet	Syrah	2021	Freixenet	Huimilpan	Qro.
243	Freixenet	Cabernet Franc	2021	Freixenet	Colón	Qro.
244	Freixenet	Syrah	2021	Freixenet	Amazcala/Colón	Qro.
245	Freixenet	Pinot Noir	2019	Freixenet	Freixenet	Qro.
249	UTNA	Tempranillo	2021	Centro de Valor	Rincón de los Romos	Ags.
250	Babal	Merlot	2020	Centro de Valor	Rincón de los Romos	Ags.
253	NA	Syrah >90%	2020	Centro de Valor	Luis Moya	Zac
254	NA	Syrah >90%	2021	Centro de Valor	Luis Moya	Zac
255	Segunda Parte	Merlot	2021	Centro de Valor	Rincón de los Romos	Ags.
258	NA	Salvador	2021	Centro de Valor	Cosío	Ags.
259	NA	Merlot	2021	Centro de Valor	Valle de las Arcinas	Zac
260	NA	Malbec	2021	Centro de Valor	Rincón de los Romos	Ags.
261	ALV (Renacimiento)	Salvador	2021	Centro de Valor	Cosío	Ags.
263	Cuatro Soles	Malbec	2021	Centro de Valor	Cosío	Ags.
264	Clos de los 8	Syrah	2021	Centro de Valor	Valle de las Arcinas	Zac.
267	Santa Mónica	Merlot	2021	Centro de Valor	Aguascalientes	Ags.
268	Santa Elena	Nebbiolo	2021	Centro de Valor	El Encino	Ags.
269	Santa Elena	Malbec	2021	Centro de Valor	La Esperanza	Ags.
270	Santa Elena	Nebbiolo	2021	Centro de Valor	La Esperanza	Ags.
271	Santa Elena	Malbec	2021	Centro de Valor	Pabellón de Arteaga	Ags.
272	Santa Elena	Cabernet Franc	2021	Centro de Valor	Pabellón de Arteaga	Ags.
273	Santa Elena	Cabernet Franc	2021	Centro de Valor	Santa Elena	Ags.

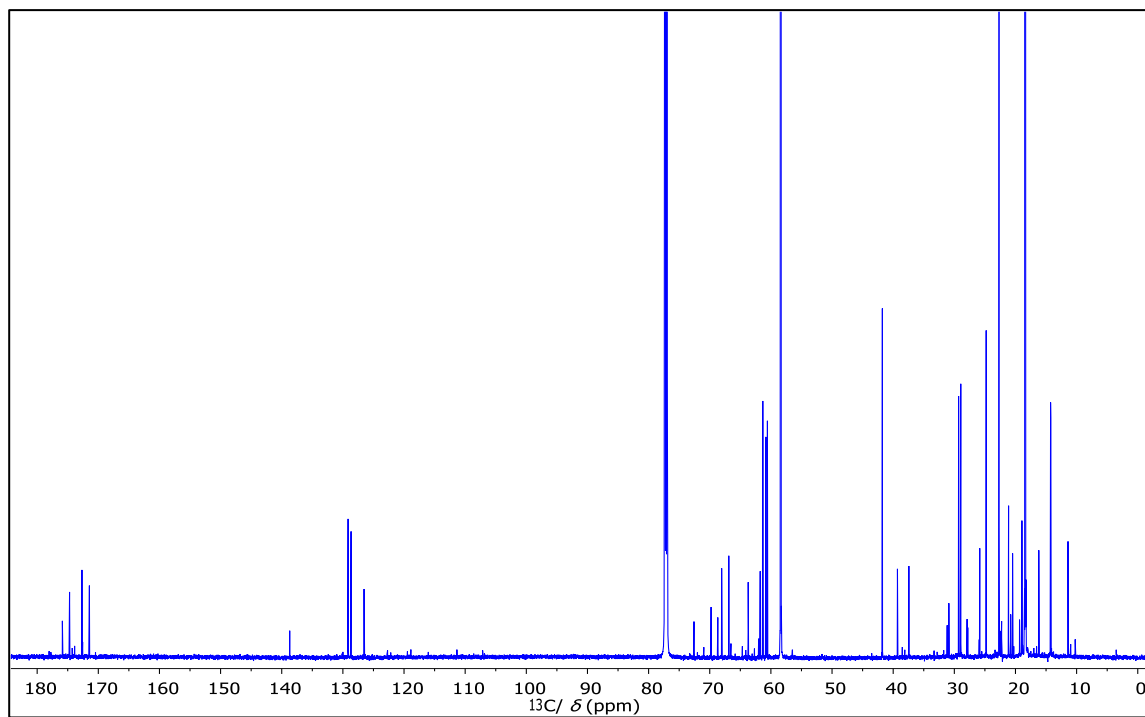
## 9.2 Anexo II. Espectros de $^1\text{H}$ -RMN con distinta relación de Vino: $\text{CDCl}_3$



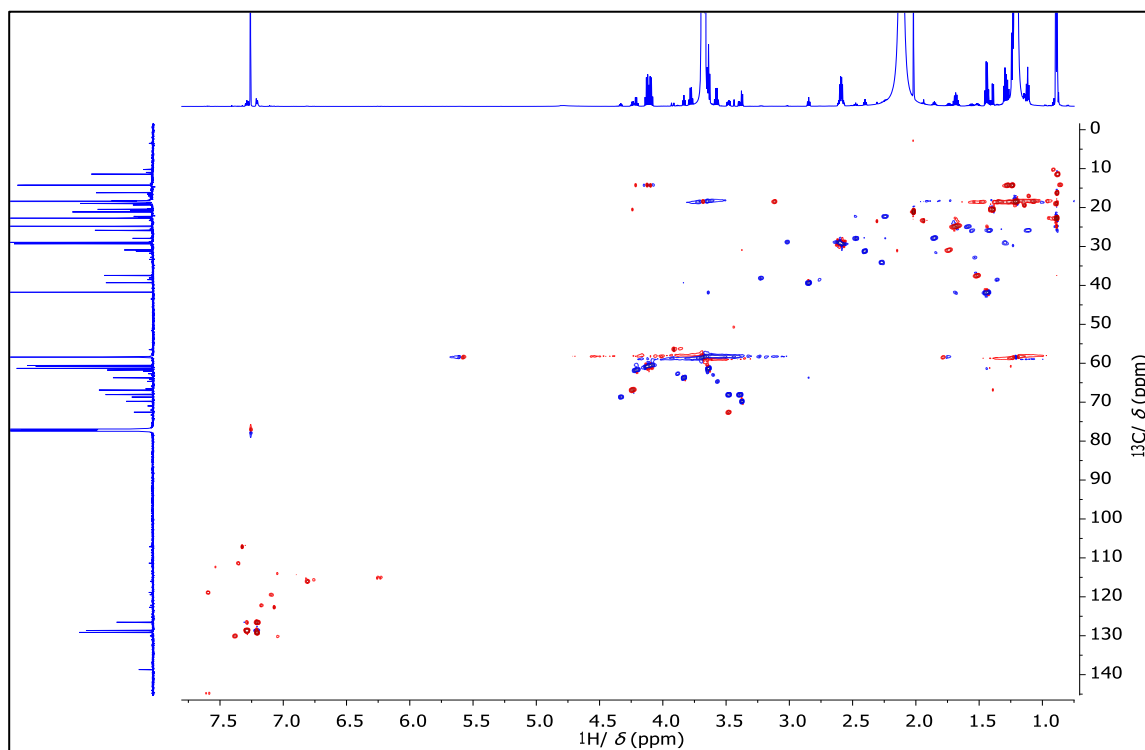
Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN superpuestos (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) de los extractos de vino tinto con relación de Vino: $\text{CDCl}_3$  (azul) 4:1 y (naranja) 14:1.



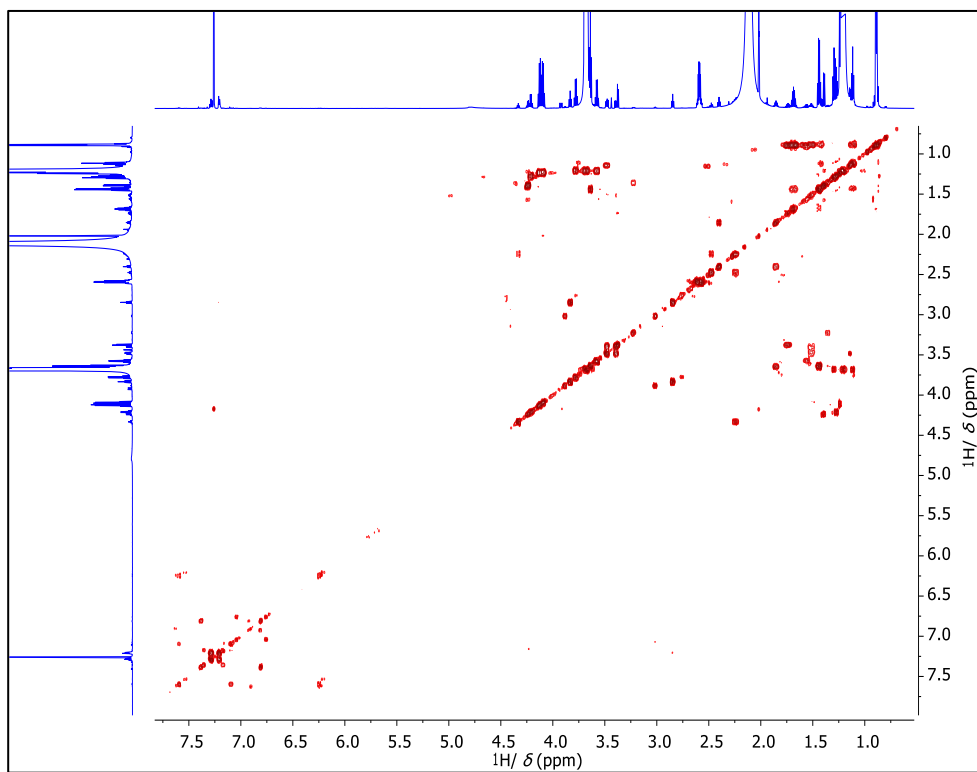
### 9.3 Anexo III. Espectros de RMN del vino tinto Malbec



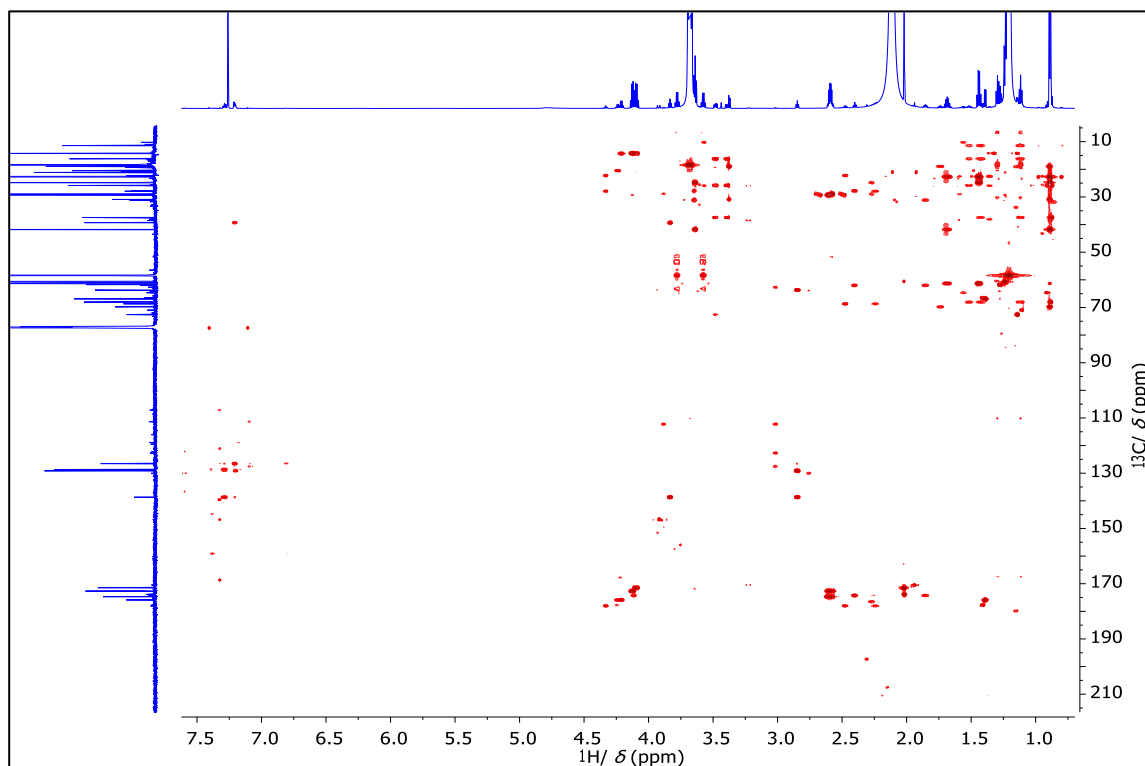
Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del extracto del vino tinto Malbec.



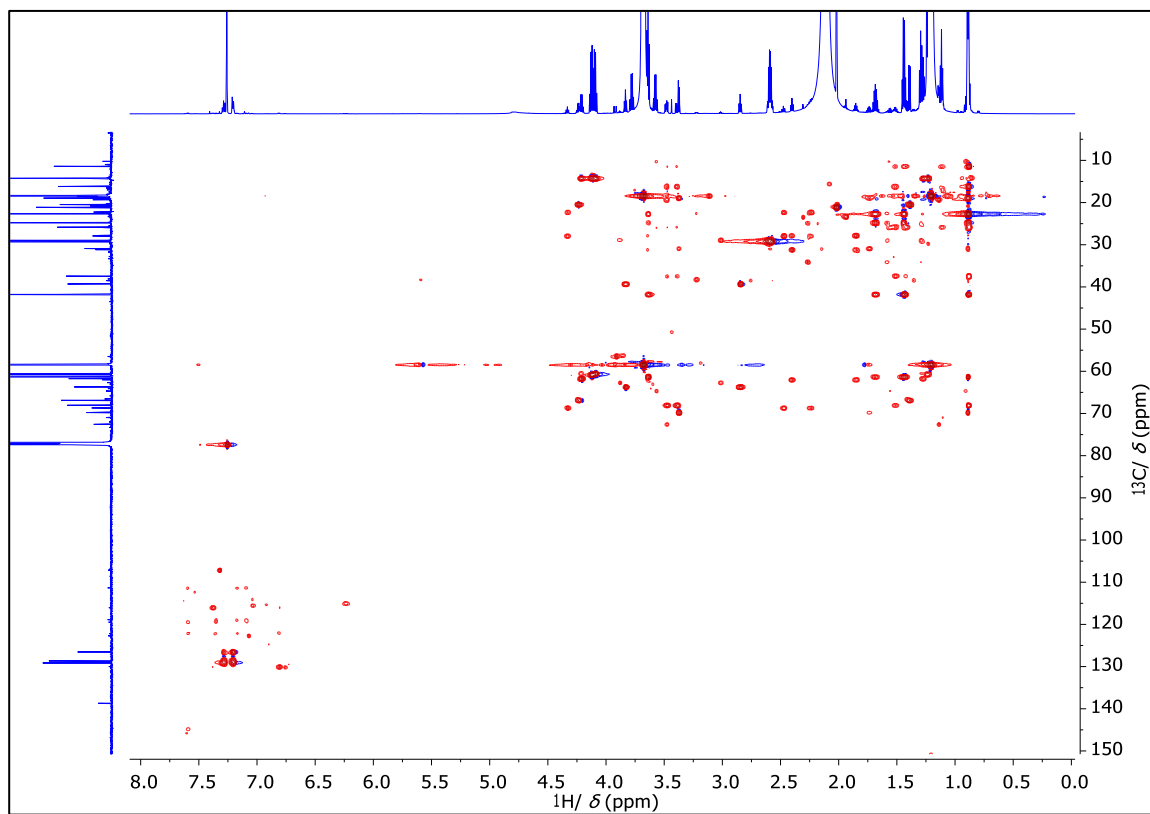
Espectro HSQC del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec.



*Espectro COSY del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec.*

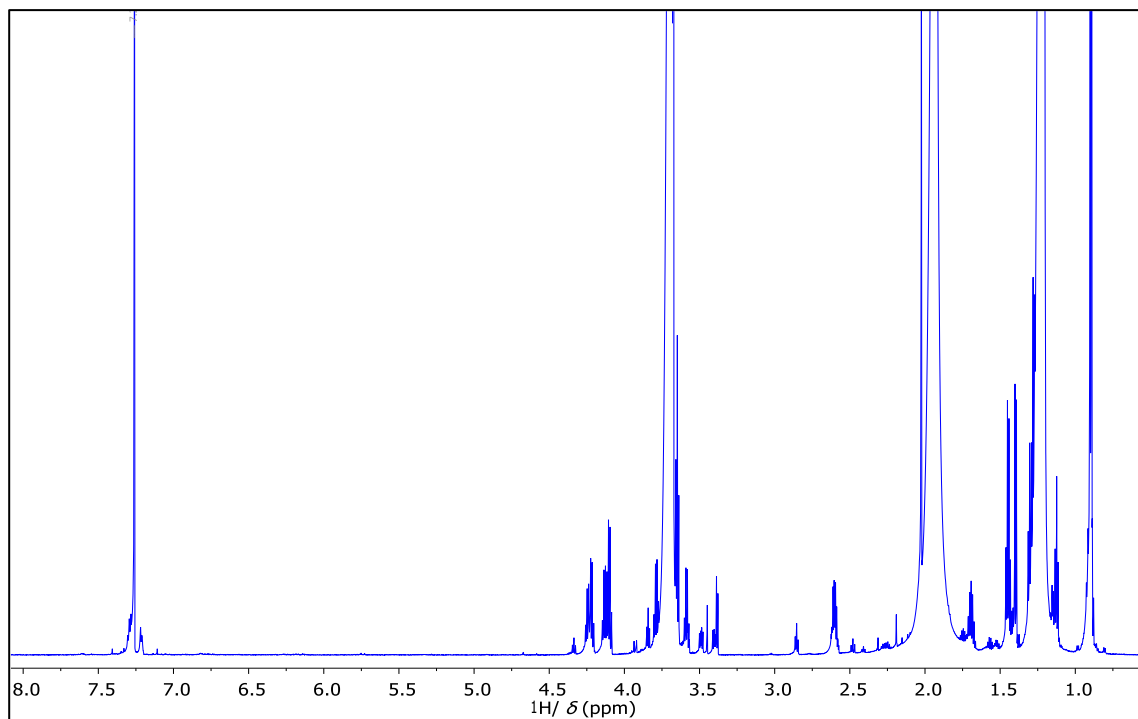


*Espectro HMBC del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec.*

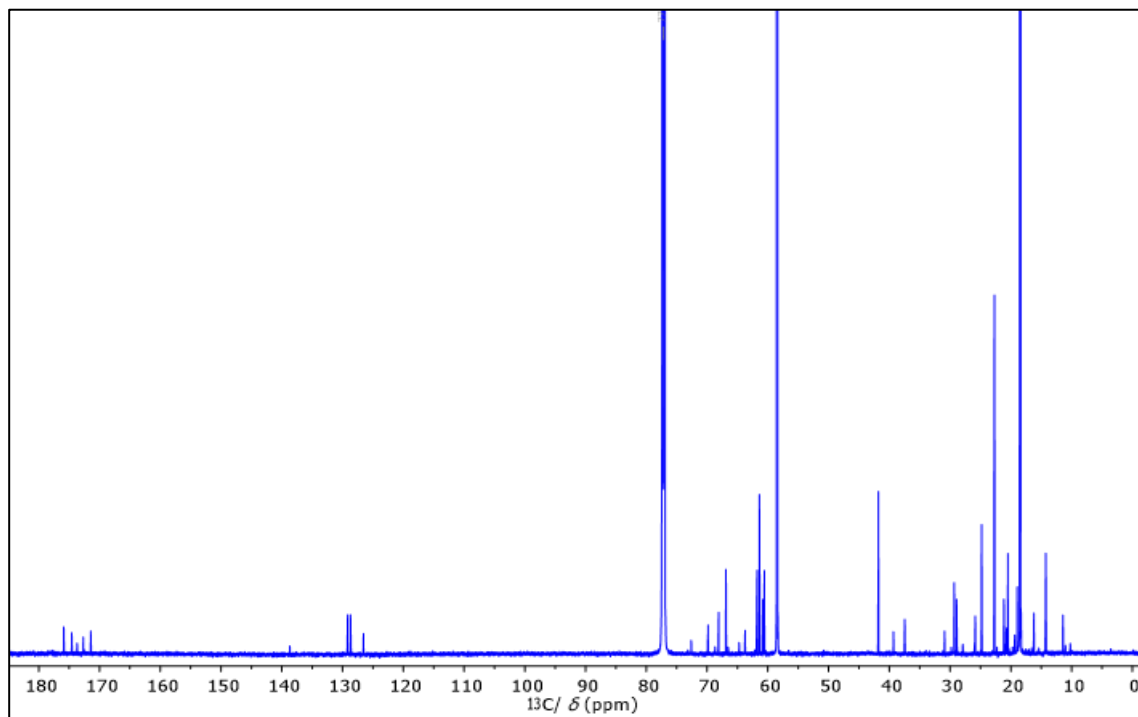


*Espectro HSQC-TOCSY del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec.*

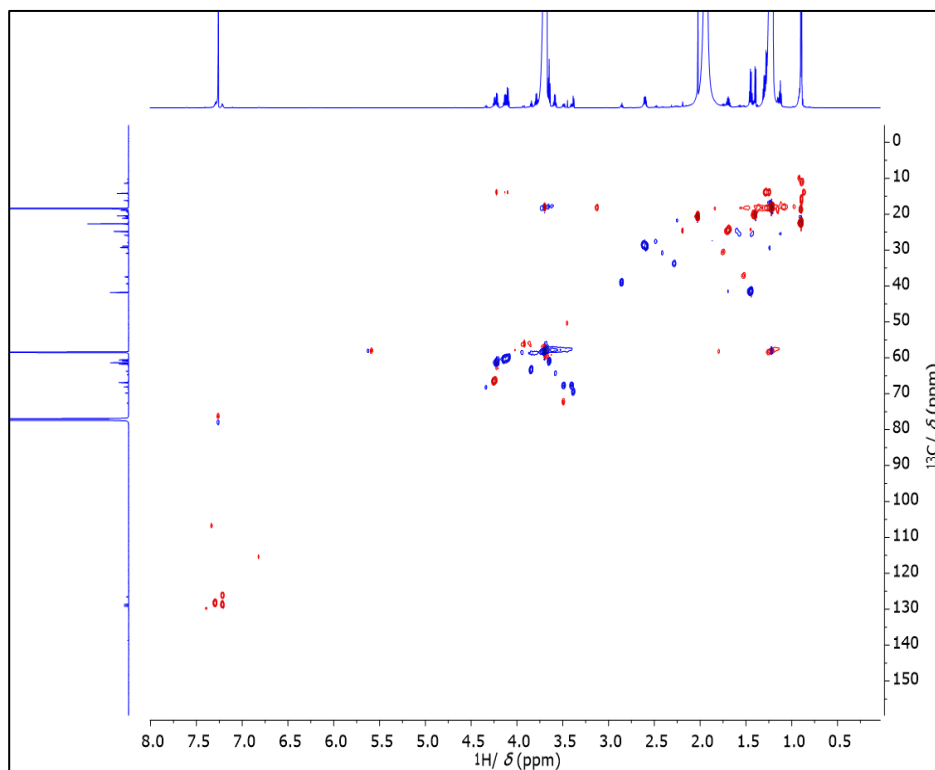
#### 9.4 Anexo IV. Espectros de RMN del "pool" de vinos tintos



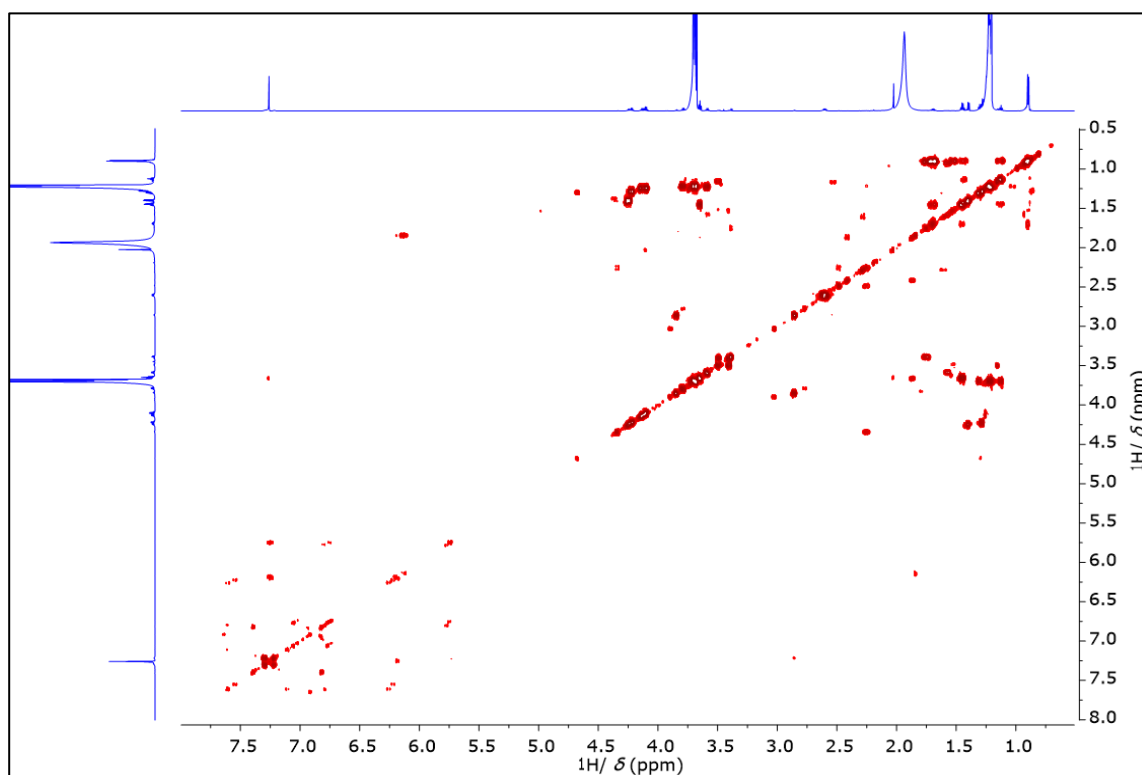
*Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del extracto del "pool" de vinos.*



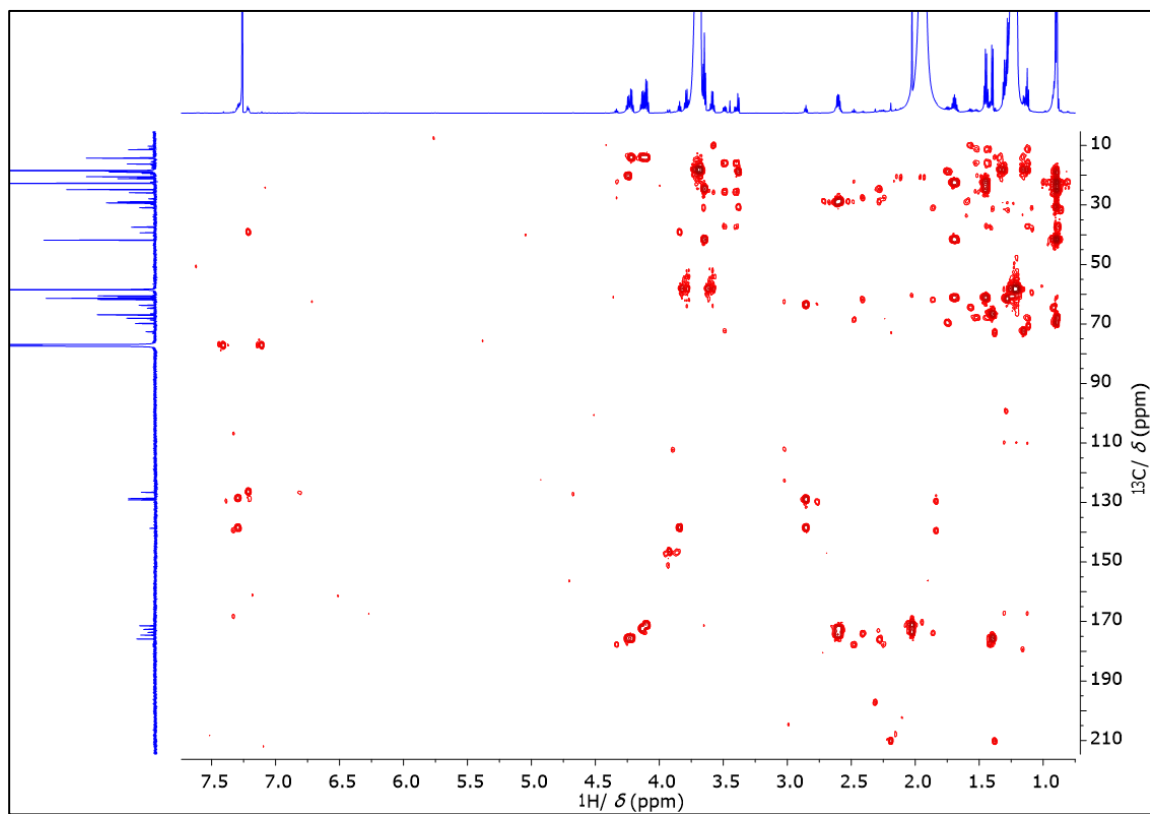
*Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 298 K) del extracto del "pool" de vinos.*



*Espectro HSQC del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del "pool" de vinos.*

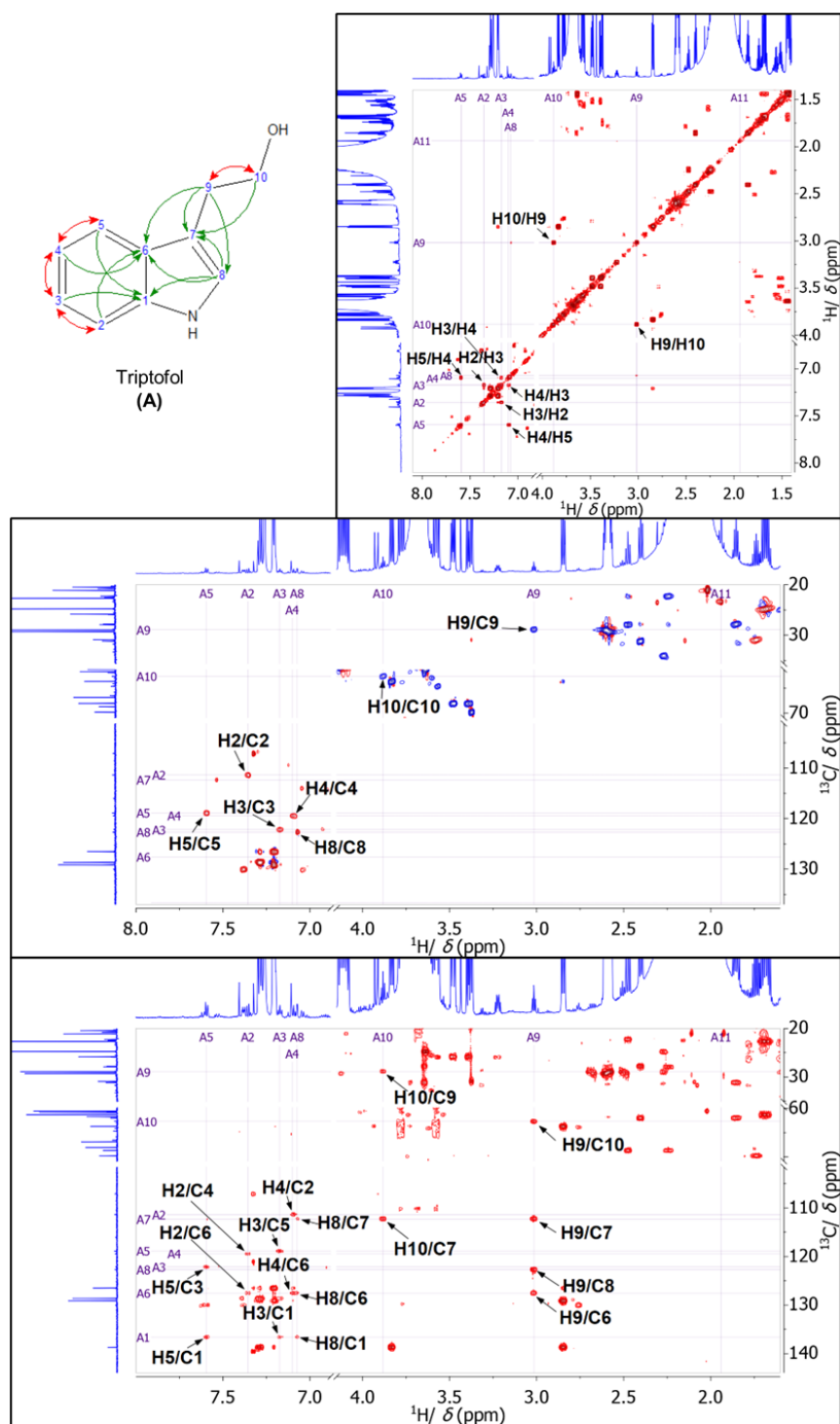


*Espectro COSY del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del "pool" de vinos.*

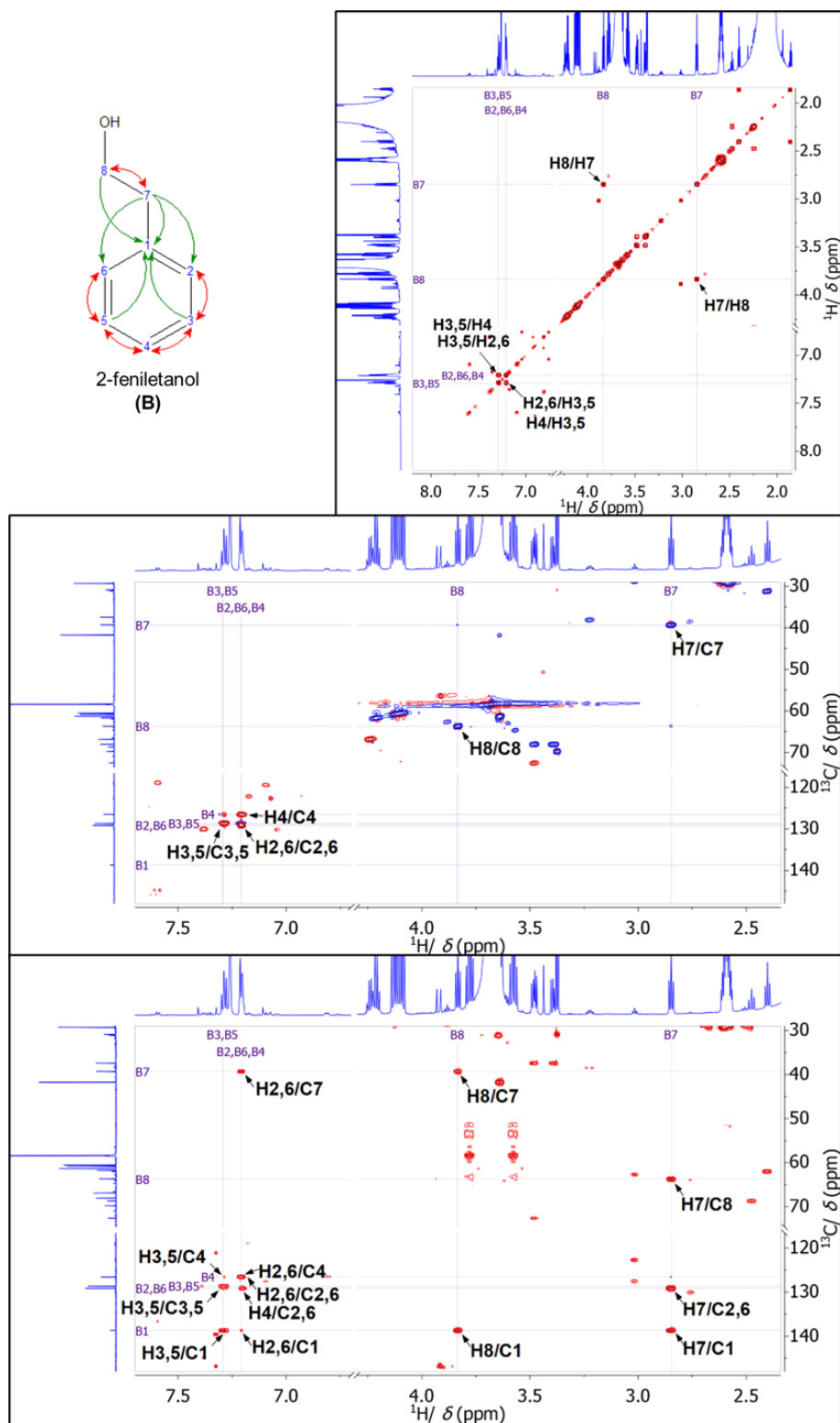


*Espectro HMBC del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del "pool" de vinos.*

## 9.5 Anexo V. Espectros bidimensionales con los metabolitos asignados del vino tinto Malbec

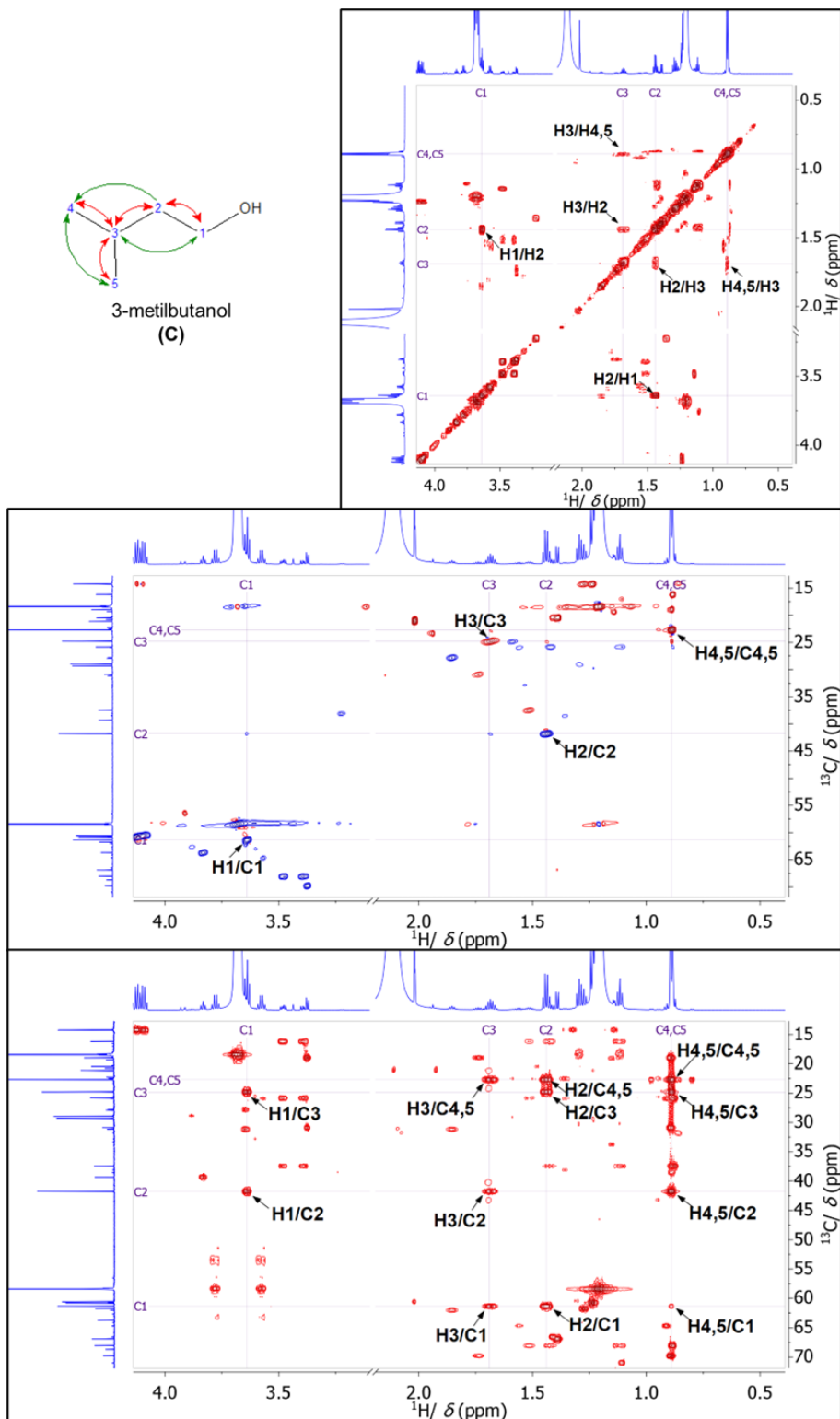


Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del triptofol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).

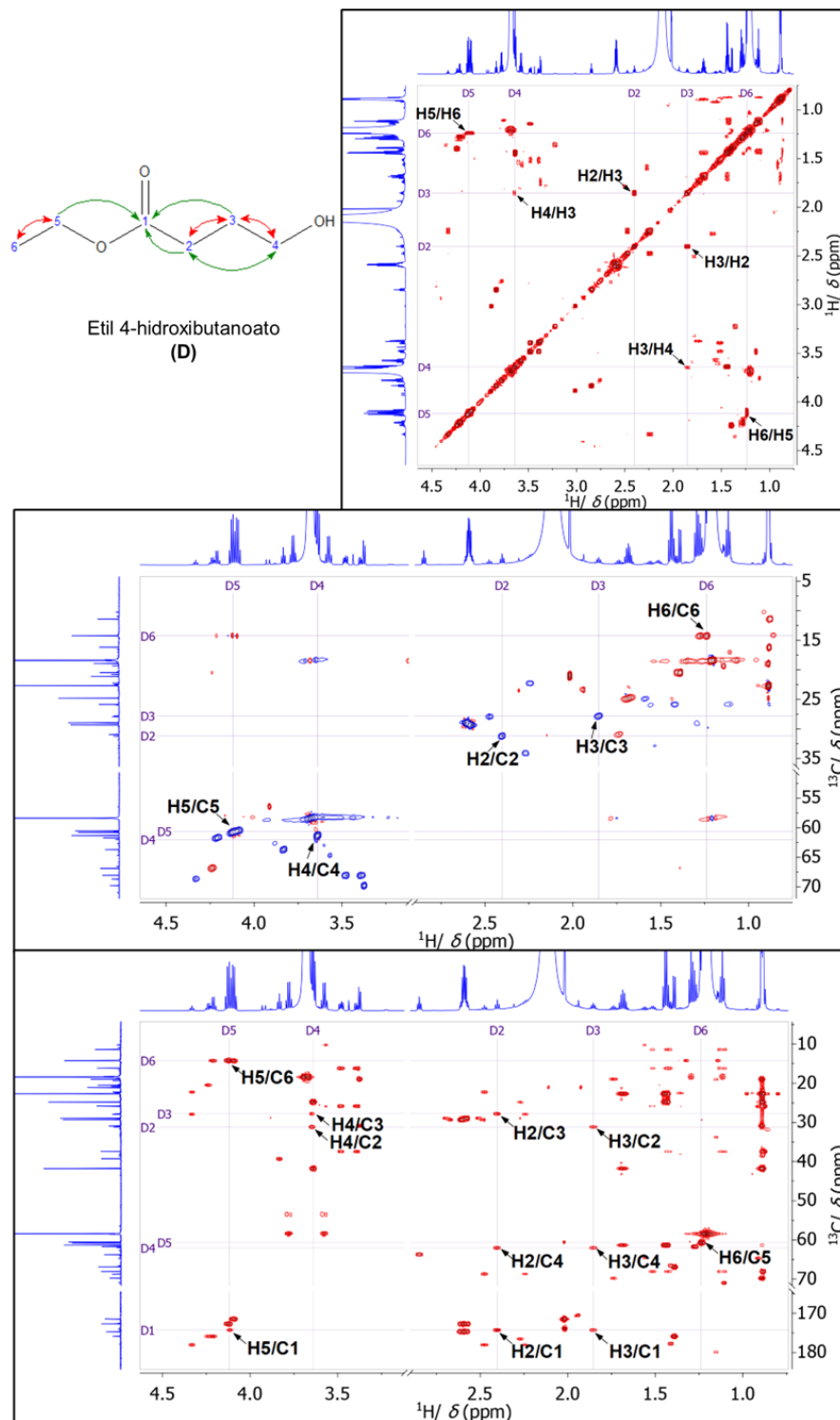


Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del 2-feniletanol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).

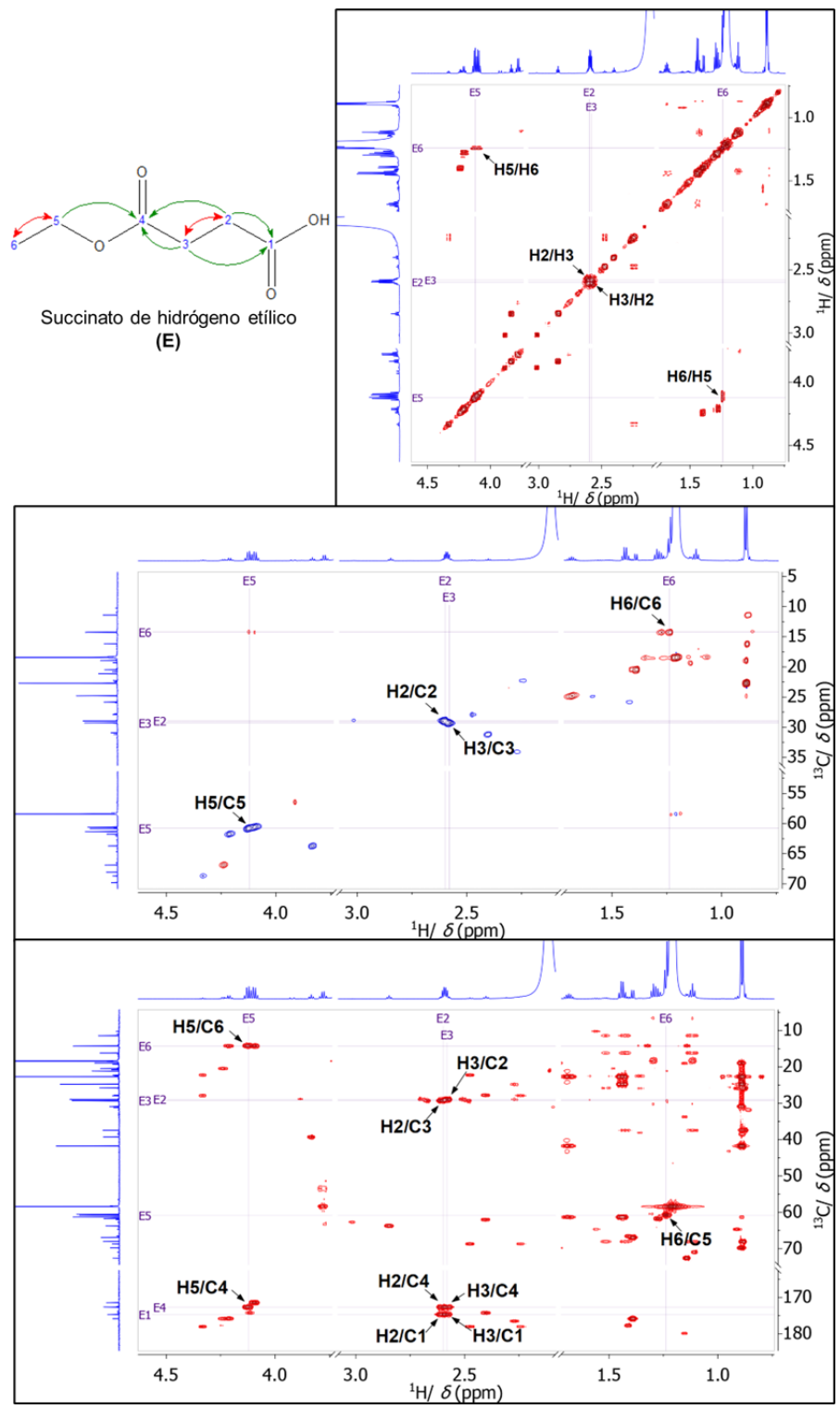




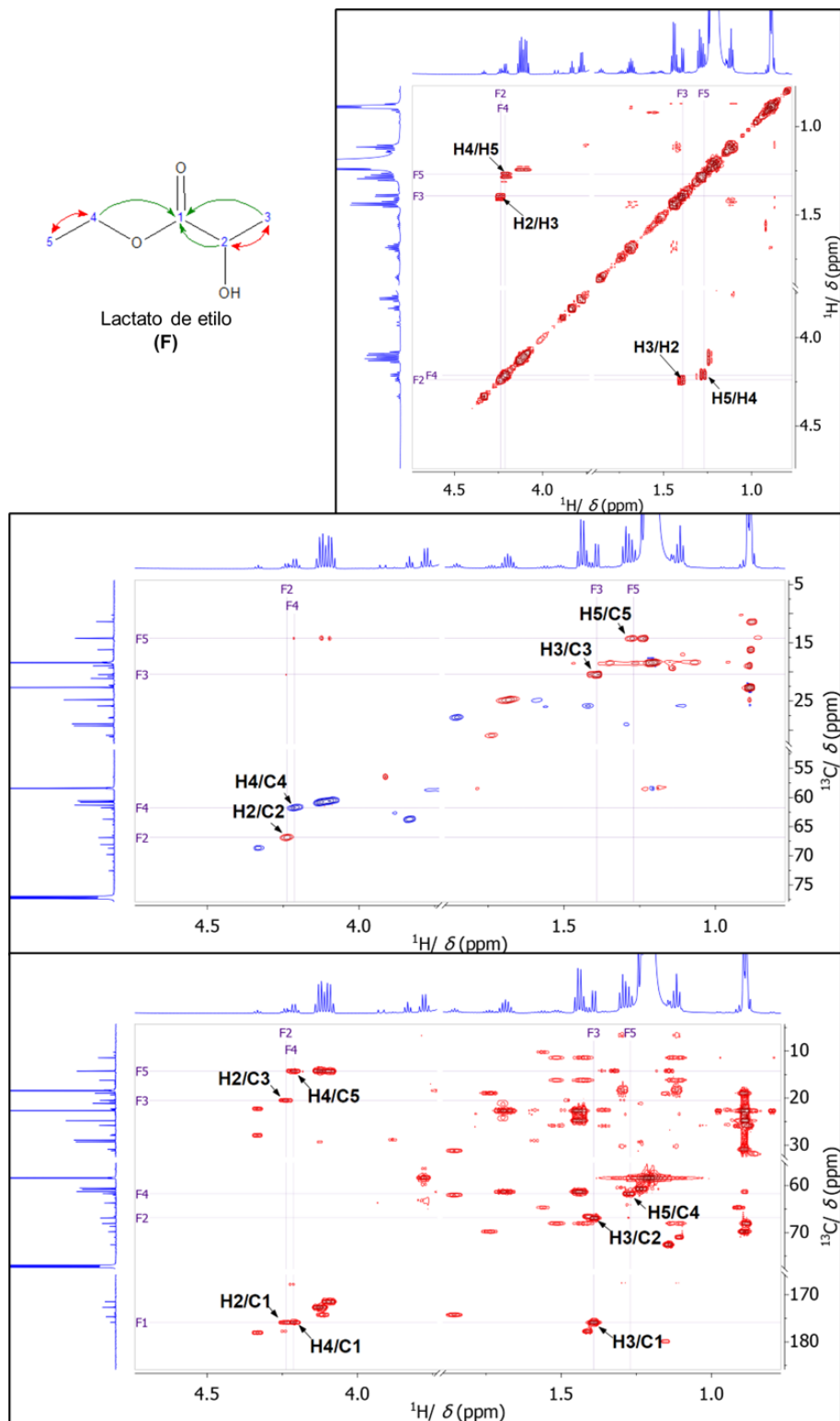
Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del 3-metilbutanol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



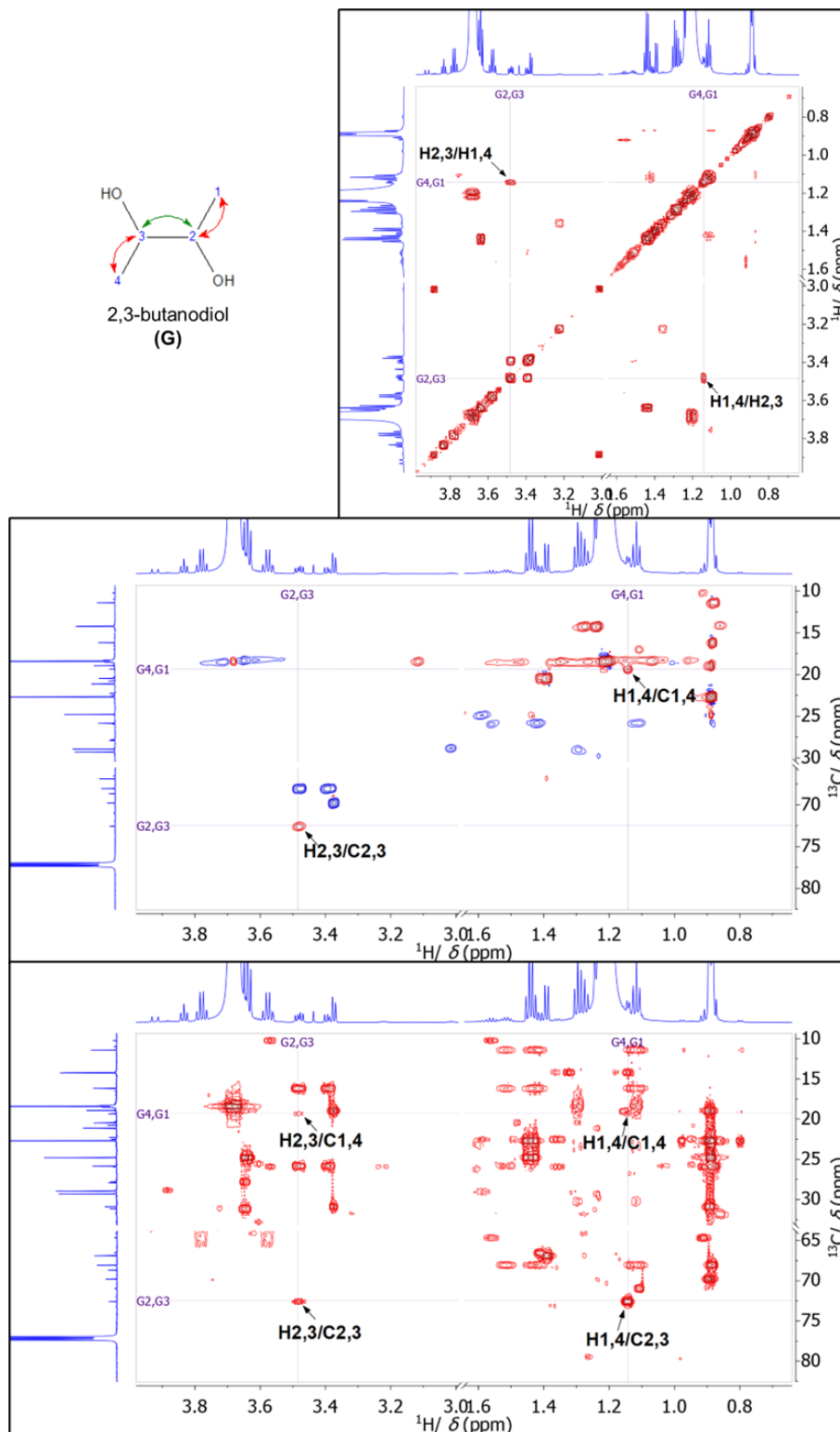
Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del etil 4-hidroxi-butanoato. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



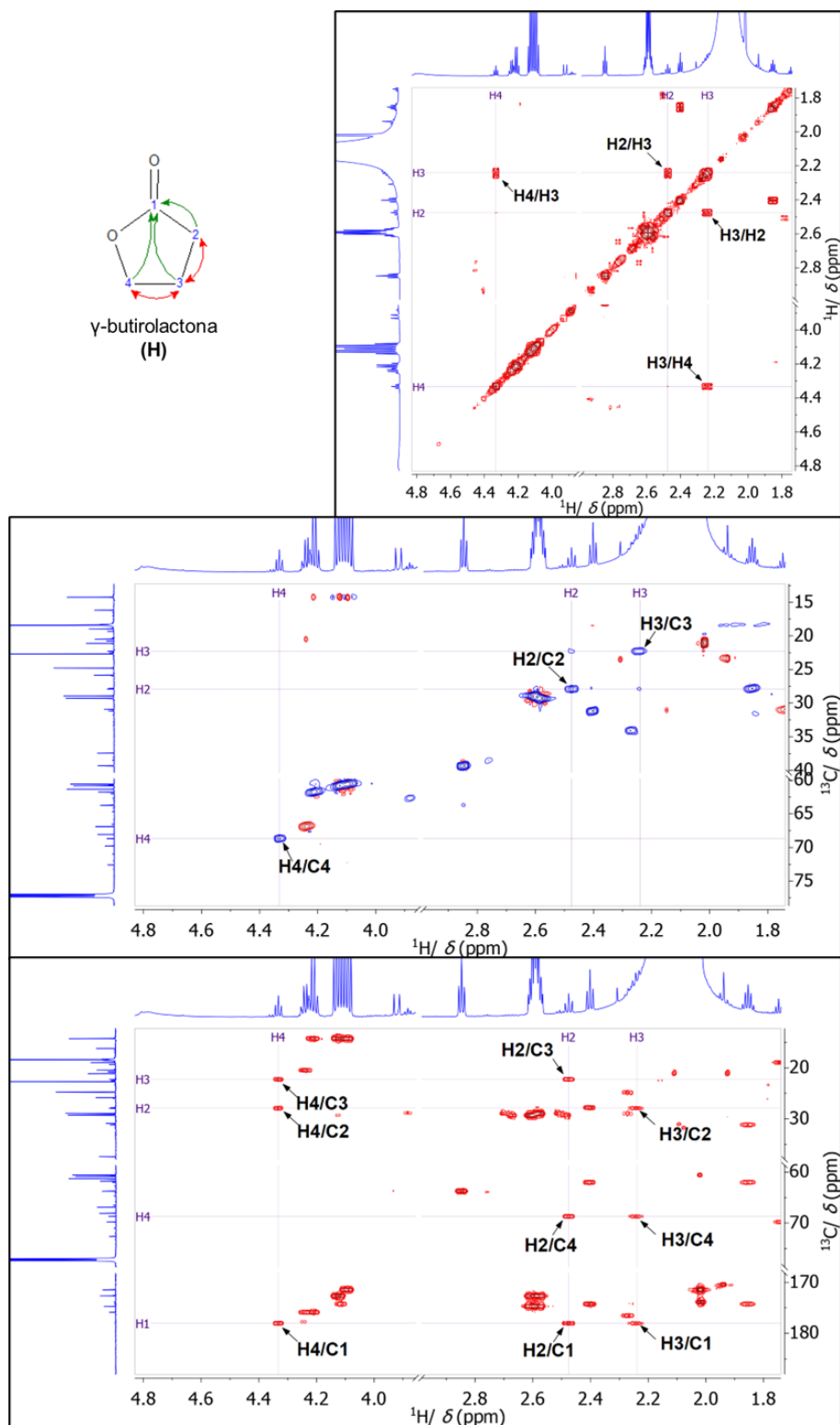
Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del succinato de hidrógeno etílico. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



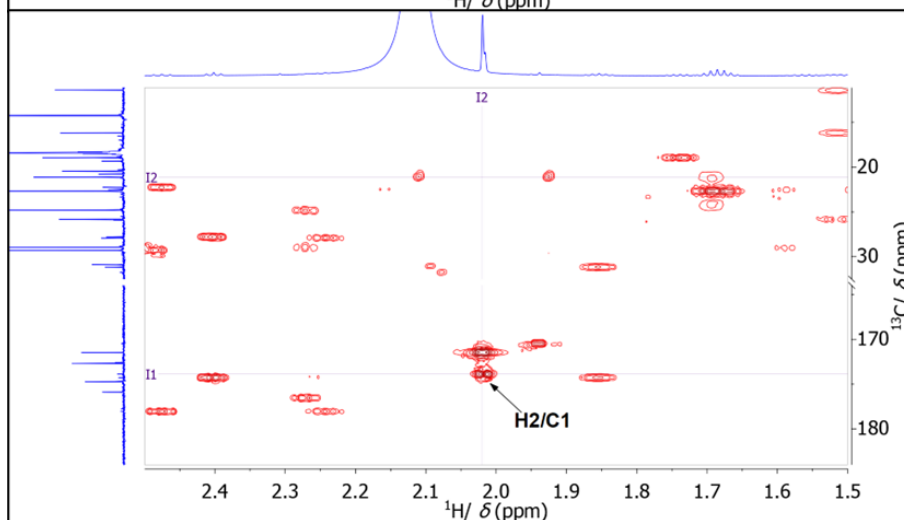
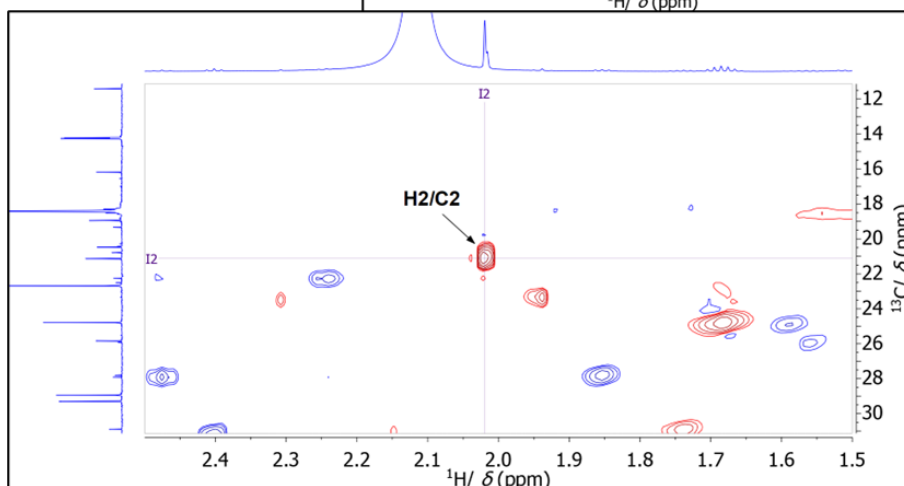
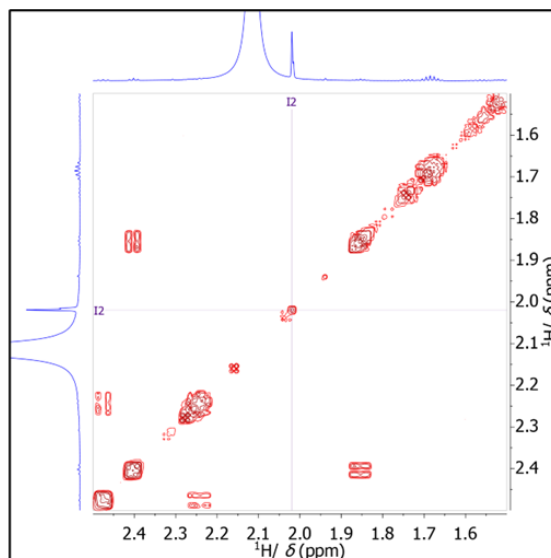
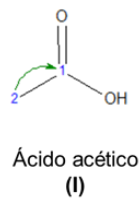
Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del lactato de etilo. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



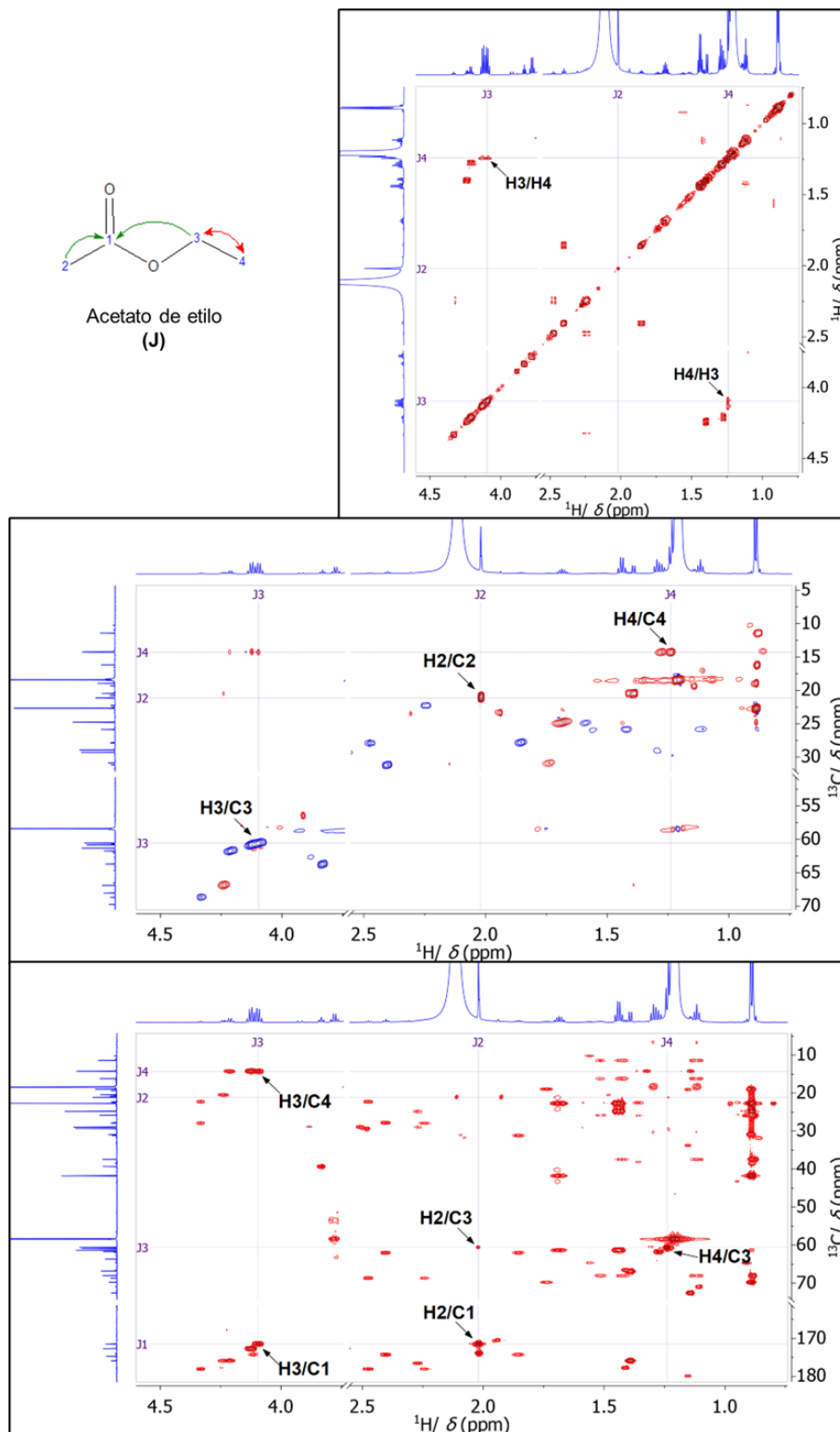
Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del 2,3-butanodiol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones de la  $\gamma$ -butirolactona. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).

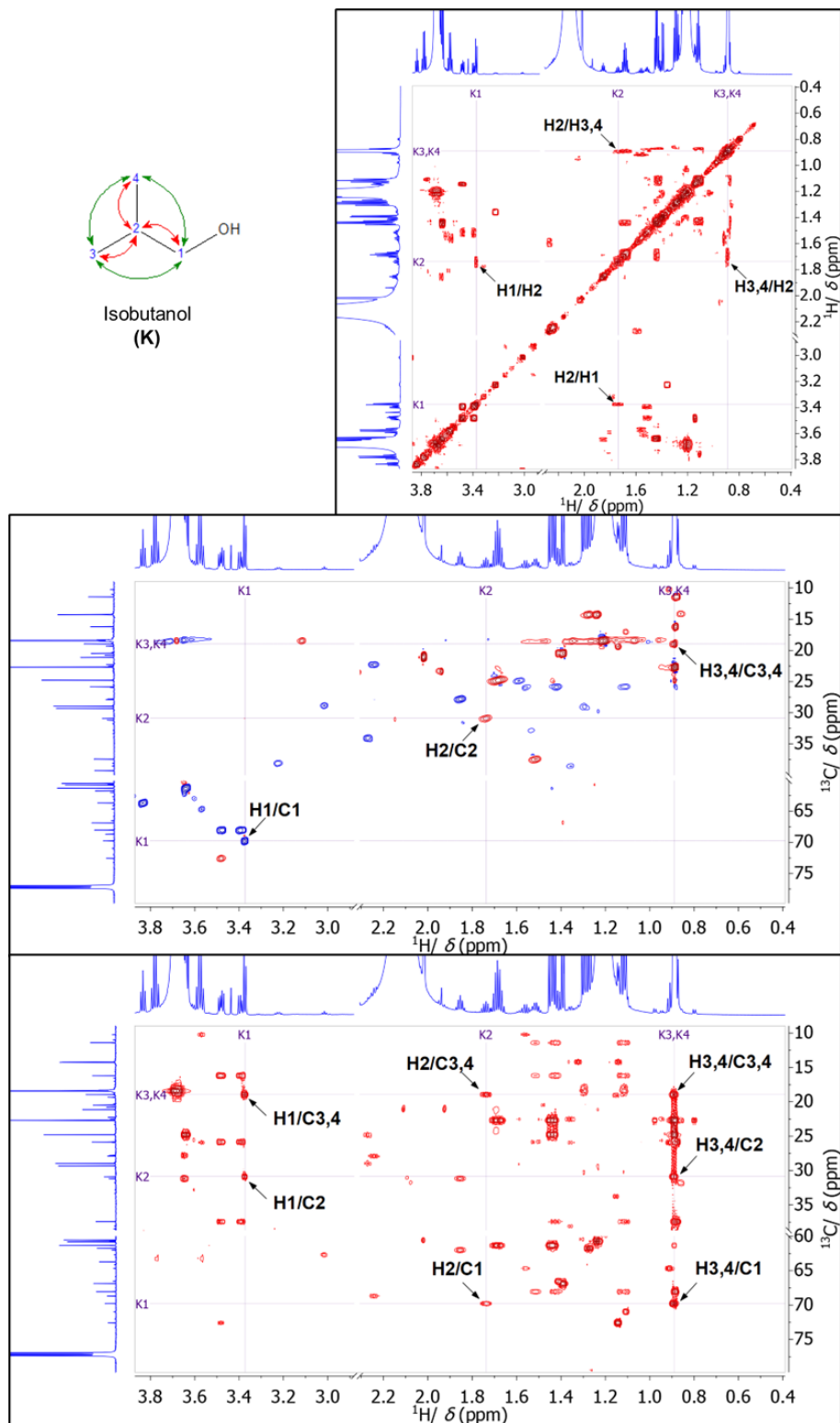


Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del ácido acético. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).

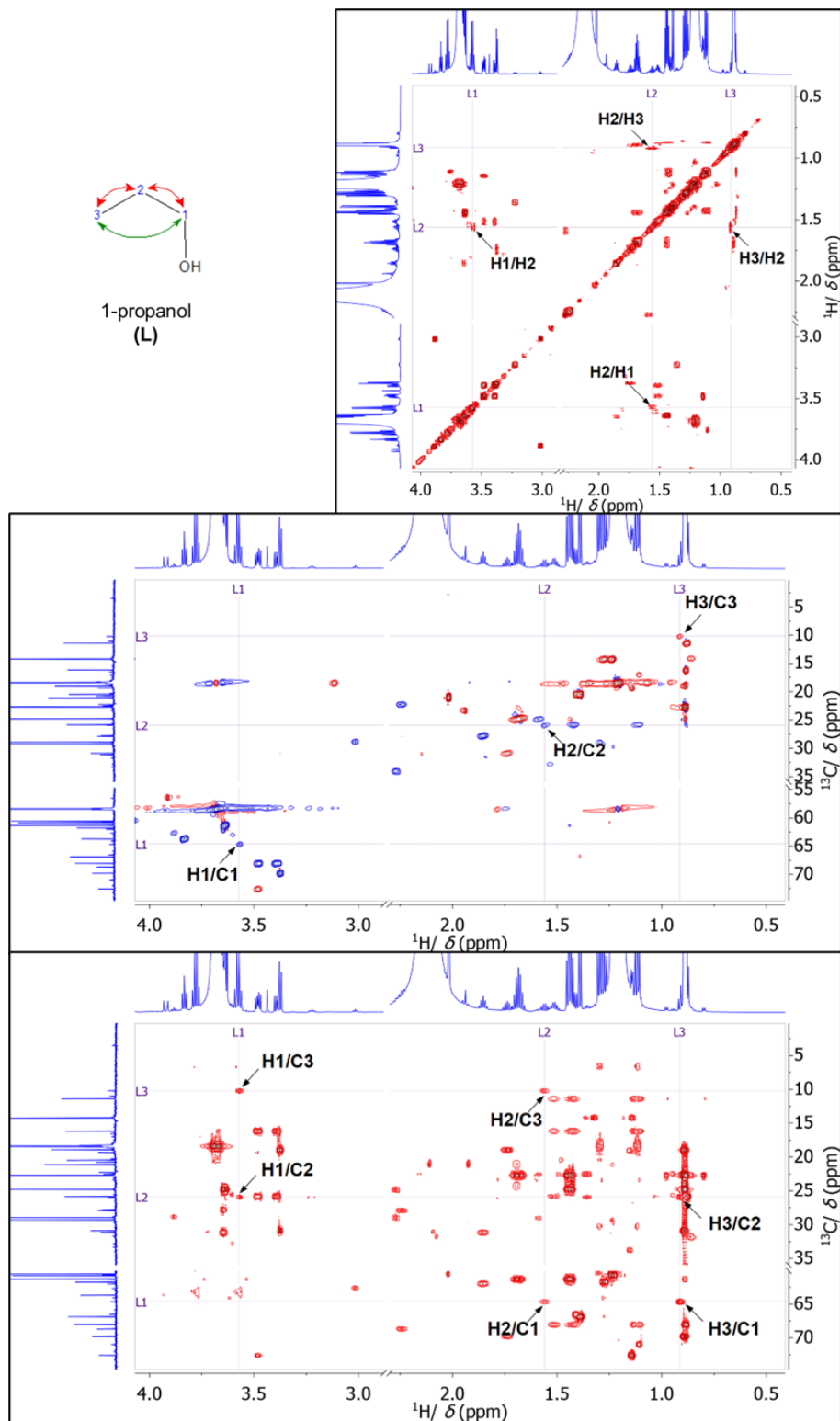


Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMQC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del acetato de etilo. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).

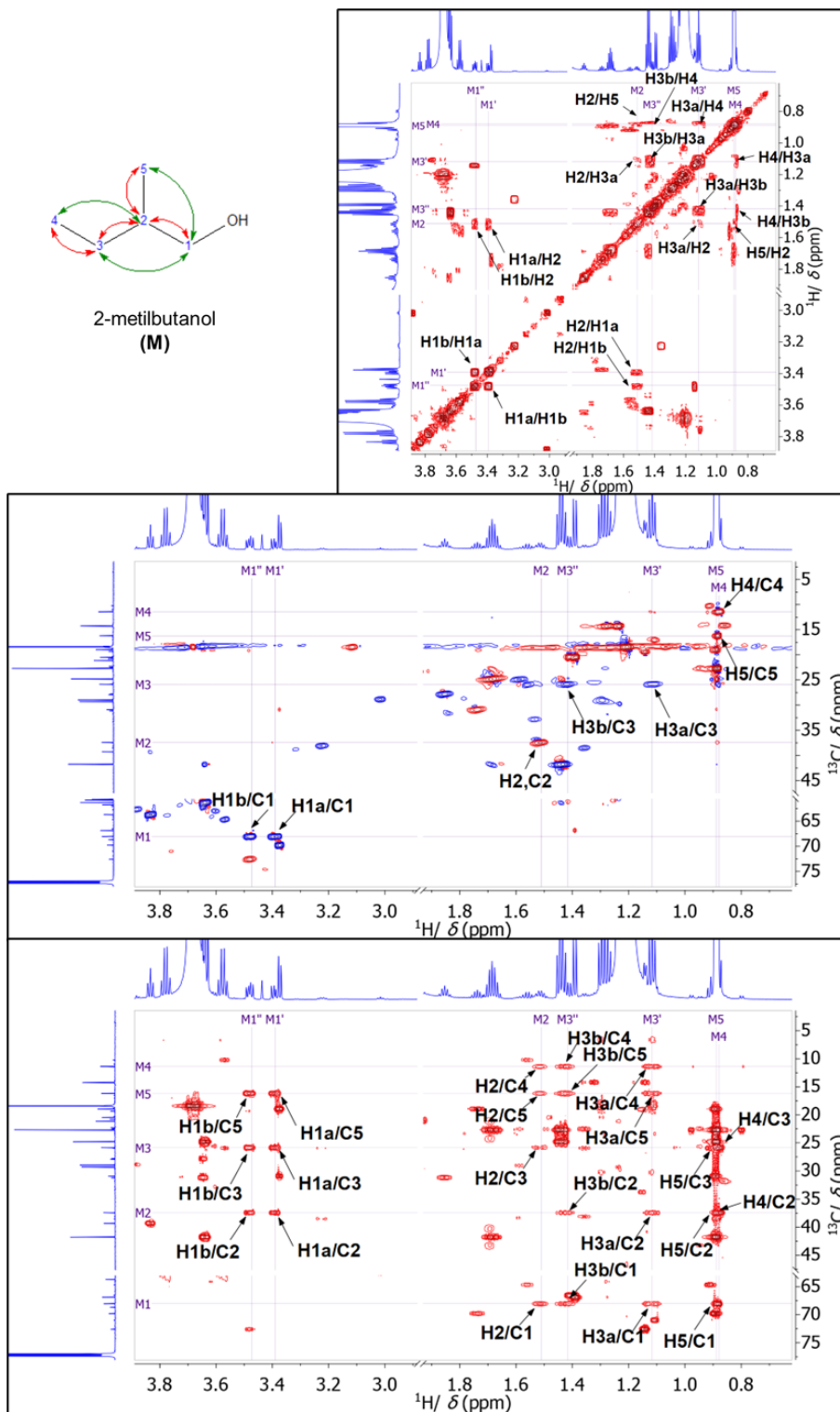




Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del isobutanol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de  $\text{CDCl}_3$  del vino tinto Malbec con las asignaciones del 1-propanol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).



Ampliación de los espectros COSY, HSQC y HMBC (en orden descendente) del extracto de CDCl<sub>3</sub> del vino tinto Malbec con las asignaciones del 2-metilbutanol. En la estructura se señalan las correlaciones clave COSY (flechas rojas) y HMBC (flechas verdes).