



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS
METABOLÓMICA BASADA EN RESONANCIA MAGNÉTICA
NUCLEAR PARA EL ESTUDIO DE JUGO DE LIMÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA

PRESENTA
MAITANE ITZEL MENDOZA SÁENZ DE BURUAGA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2024





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: FRANCISCO ROJO CALLEJAS

VOCAL: JOSE FEDERICO DEL RIO PORTILLA

SECRETARIO: NURIA ESTURAU ESCOFET

1er. SUPLENTE: SILVIA CITALLI GAMA GONZALEZ

2°SUPLENTE: JERONIMO CABRERA PERALTA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:

INSTITUTO DE QUÍMICA

LABORATORIO UNIVERSITARIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Nuria Esturau Escofet

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. en C. Martha Elena García Aguilera

SUSTENTANTE:

Maitane Itzel Mendoza Sáenz de Buruaga

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

A la Dra. Martha Elena García Aguilera por todo el tiempo brindado, todas sus enseñanzas y por su tan valiosa amistad.

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

A mis padres y hermanos por brindarme siempre su amor y apoyo incondicional.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	2
3. OBJETIVOS	2
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	2
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	2
4. ANTECEDENTES	3
4.1. CÍTRICOS.....	3
4.1.2. LIMONES Y SU COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	4
4.1.3. COMERCIALIZACIÓN DE LIMONES EN MÉXICO	5
4.2. METABOLÓMICA	6
4.2.1. METABOLÓMICA APLICADA A LOS ALIMENTOS.....	7
4.2.2 PLATAFORMAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA	7
4.2.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	7
4.3. METABOLÓMICA BASADA EN RMN DE CÍTRICOS	10
4.4 QUIMIOMETRÍA.....	11
5. METODOLOGÍA.....	12
5.1. MUESTRAS.....	12
5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS	12
5.3. ADQUISICIÓN DE EXPERIMENTOS DE RMN	12
5.4. PROCESAMIENTO DE ESPECTROS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
5.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS.....	14
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	15
6.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN LOS ESPECTROS DE ¹ H-RMN	15
6.2. ESPECTROS DE ¹ H-RMN DE JUGO DE LIMÓN	17
6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE	18
6.3.1 VARIEDAD DE ESPECIE.....	18
6.3.2 ORIGEN GEOGRÁFICO	22
6.3.2.1 ANÁLISIS DE ORIGEN GEOGRÁFICO DE JUGO DE LIMÓN ITALIANO.....	24
6.3.2.2 ANÁLISIS DE ORIGEN GEOGRÁFICO DE JUGO DE LIMÓN PERSA.....	26
6.3.2.3 ANÁLISIS DE ORIGEN GEOGRÁFICO DE JUGO DE LIMÓN AGRIO	28
7. CONCLUSIONES	31
8. BIBLIOGRAFÍA	32

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIMBOLOGÍA

°C	Grados centígrados
¹ H-RMN	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protón unidimensional
B ₀	Campo magnético
D ₂ O	Agua deuterada
DCl	Ácido clorhídrico en agua deuterada
FID	Decaimiento por inducción libre (<i>Free Induction Decay</i>)
H ₂ O	Agua
J	Constante de acoplamiento
K	Kelvin
mL	Mililitros
NaOD	Hidróxido de sodio en agua deuterada
OPLS-DA	Proyección ortogonal a las estructuras latentes con análisis discriminatorio (<i>Orthogonal Projection to Latent Structures Discriminant Assay</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (<i>Principal Component Assay</i>)
PCs	Componentes principales
pH	Potencial de hidrógeno
Q ²	Coefficiente de predicción
R ² X	Varianza en la matriz X
R ² Y	Varianza en la matriz Y
rf	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
TSP	Sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)propiónico
VIP	Proyección de Variables por su Importancia (<i>Variable of Important Projection</i>)

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos han desempeñado un papel fundamental en la historia agrícola y económica de México, siendo una de las naciones más destacadas en la producción y exportación de estos frutos a nivel mundial. La caracterización y cuantificación de los metabolitos que componen a los cítricos, la determinación de su origen geográfico, el control de calidad y la determinación de su autenticidad, han dado lugar a una continua investigación en este campo. Por ello, el desarrollo de nuevas metodologías de análisis es de gran importancia hoy en día.

La metabolómica es considerada la ciencia ómica de más reciente aparición. Mediante su enfoque técnico y sistemático logra la identificación y cuantificación de los metabolitos presentes en una muestra biológica o en un organismo dado. El desarrollo de la metabolómica ha tenido un rápido crecimiento gracias al uso conjunto de las técnicas analíticas modernas y los métodos estadísticos multivariantes (MVA).

Entre las plataformas analíticas más empleadas se encuentran la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectroscopía de Masas (EM); ambas son ampliamente usadas en la actualidad y complementarias entre sí. La RMN no es destructiva, necesita poca o nula preparación previa de muestra y se caracteriza por su alta robustez, rapidez y reproducibilidad, lo que la hace muy atractiva para estudios de metabolómica.

En la industria alimentaria, la metabolómica basada en RMN es aplicada en: la identificación de biomarcadores, el control de calidad, la trazabilidad, la determinación del origen geográfico, el estudio de patógenos e infecciones y la identificación de adulteración de los productos.

Este trabajo forma 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 estudio de “Huellas dactilares de RMN” para los jugos de cítricos.

En la presente tesis se realiza el estudio de muestras de jugo de limón de tres variedades diferentes: persa (*Citrus latifolia* Tan), italiano (*C. limon*) y agrio (*Citrus x aurantiifolia*), provenientes de distintos orígenes geográficos mediante espectroscopia de RMN y análisis multivariante para conocer las similitudes y/o las diferencias en el perfil metabolómico de las muestras. Este trabajo sienta las bases para determinar en un futuro la huella dactilar de los jugos mexicanos.

2. HIPÓTESIS

El jugo de limón presenta un perfil metabolómico característico de acuerdo con su variedad de especie y su origen geográfico, y puede ser identificado mediante el análisis multivariante de sus datos espectrales de ^1H -RMN.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el análisis de jugo de limón de 3 variedades: persa (*Citrus latifolia* Tan), italiano (*C. limon*) y agrio (*Citrus x aurantiifolia*), y de diferentes regiones geográficas mediante su perfil metabolómico basado en ^1H -RMN y análisis estadístico multivariante para su clasificación.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el método de preparación y análisis de las muestras jugo de limón para su estudio por ^1H -RMN.
- Determinar, mediante el análisis quimiométrico de los datos de ^1H -RMN, las similitudes y/o diferencias entre los grupos de muestras en estudio.
- Identificar los metabolitos responsables de la diferenciación entre las variedades y zonas geográficas de las muestras analizadas.

4. ANTECEDENTES

4.1. CÍTRICOS

El género *Citrus* pertenece a las angiospermas, provenientes de la familia Rutaceae y subfamilia Aurantioideae. Su cultivo se da principalmente en regiones donde la materia orgánica del suelo es limitada y hay una capacidad de retención de nutrientes (1). Este género es conocido mundialmente no sólo por su agradable sabor sino también por sus numerosos componentes bioactivos, antioxidantes y alta cantidad de nutrientes, como son los carotenoides, flavonoides, terpenos y limonoides. Además, el aceite esencial de los cítricos, rico en limonoides y terpenos, es un producto de importancia económica por sus potentes propiedades antioxidantes, antimicrobianas y aromatizantes (2).

De acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) la alta importancia en la industria de la citricultura se basa en su reconocimiento como alimentos cuyas características funcionales inciden de manera positiva en la salud (3). La composición de los cítricos presenta una marcada influencia de varios factores, incluyendo la variedad específica del cítrico, las condiciones de cultivo, el clima, el suelo y la madurez en el momento de la cosecha, entre otros (4).

México se ubica en el quinto lugar como productor de naranja, segundo lugar como productor de limones y limas, cuarto lugar como productor de toronja y pomelos y treceavo lugar como productor de mandarina, clementina y tangerinas. En los últimos años, el aumento en la demanda de exportación de estos frutos refleja una mejora significativa en la productividad y un impulso notable en sus operaciones de exportación a nivel internacional (5).

La citricultura en México representa una actividad de gran relevancia dentro del mercado nacional debido a los altos ingresos económicos y las oportunidades de empleo que genera teniendo dos principales salidas de venta, el mercado de fruta fresca y como fruta procesada o transformada en otros productos como: zumo, aceites esenciales y pulpas.

Son 28 entidades federativas las que comprenden la región citrícola del territorio mexicano tal como se muestra en la Figura 1 (5,6); sin embargo, la principal zona productora se encuentra mayormente concentrada en el este de México (Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León, Puebla, Yucatán, Tabasco, Campeche y Quintana Roo).



Figura 1: Mapa de la República Mexicana que indica la distribución de la producción de cítricos por estado en toneladas durante el año 2021. Recuperado de: <https://dj.senasica.gob.mx/>

4.1.2. LIMONES Y SU COMPOSICIÓN QUÍMICA

El limón es una de las especies de cítricos de cuyo árbol de múltiples flores presenta una producción constante durante todo el año. El jugo extraído de este fruto se caracteriza por su alta acidez y es generalmente abundante a excepción de cuando el árbol se encuentra bajo algún estrés biótico o abiótico (7).

La composición química del limón es bien conocida y es estudiada por los numerosos compuestos bioactivos presentes, los cuales presentan principalmente propiedades antioxidantes, antimutagénicas, anticancerígenas, antialérgicas, entre otros beneficios para la salud. El limón está conformado principalmente por una alta cantidad de agua, compuestos cumarínicos, ácidos carboxílicos, carbohidratos, así como aminoácidos, vitaminas del grupo B y vitamina C. Los principales compuestos que determinan su actividad biológica y que están presentes tanto en el fruto como en el jugo extraído son los flavonoides, entre los que se encuentran la neohesperidina, la naringina y la hesperidina. En comparación con otras especies cítricas el limón tiene el mayor contenido de eriocitrina (8).

Otro grupo de compuestos presentes son los ácidos fenólicos entre los cuales el ácido ferúlico y el ácido sinápico se encuentran comúnmente en el jugo mientras que el ácido p-hidroxibenzoico prevalece en el fruto. Los limonoides, otro grupo de compuestos encontrados en estos cítricos, se caracterizan por ser metabolitos secundarios altamente oxidados con cadenas principales triterpenoides policíclicas y se encuentran en las semillas, la pulpa y la cáscara. Los dos limonoides más predominantes son la limonina y nomilina cuya

concentración depende del crecimiento y de las etapas de maduración del fruto. Por otra parte, los principales componentes del aceite esencial son los monoterpenoides, furanocumarinas lineales (psoralenos) y flavonas polimetoxiladas (9).

4.1.3. COMERCIALIZACIÓN DE LIMONES EN MÉXICO

Según cifras reportadas por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), México es el segundo productor de limas y limones a nivel internacional. Este producto es el segundo cultivo más producido a nivel nacional después de las naranjas, con un porcentaje del 36% de la producción nacional total de cítricos (10).

Su oferta anual se mantiene constante gracias a la producción generalizada en los 28 estados de la República en donde se cuenta con una infraestructura de riego más sólida y árboles jóvenes y eficientes. Además, su cosecha es óptima durante todo el año teniendo niveles máximos entre mayo y octubre.

Los principales estados productores son Veracruz con una aportación del total nacional del 35%, Michoacán con el 24.2%, Colima con el 11.6% y Oaxaca con el 10.7%. El territorio mexicano cuenta con 217,000 hectáreas entre los años 2022 y 2023 destinados a la producción de limas y limones con un incremento de producción de toneladas por hectárea de 4.92 en 2022 a 5.49 en 2023 (11).

En México se comercializan y producen principalmente tres variedades de limones:

Limón persa (Citrus latifolia Tan.): De origen híbrido, este fruto se caracteriza por ser físicamente ovalado u oblongo de 4 a 6.25 cm de ancho y de 5 a 7.25 cm de largo, a menudo con extremos alargados. Generalmente no tiene o tiene muy pocas semillas, es más grande y tiene una piel más gruesa que la lima. Aunque generalmente se recoge y vende cuando está verde, la fruta es de color verde amarillento o amarillo cuando está completamente madura (Figura 2a). Posee un aroma fragante y especiado y un sabor ácido. Esta variedad es apreciada comercialmente debido a su tamaño, ausencia de semillas, rusticidad, ausencia de espinas en los arbustos y mayor vida útil de la fruta. Veracruz y Oaxaca son los principales productores en México (12).

Limón agrio o mexicano (Citrus x aurantiifolia): Fruto caracterizado por una apariencia física ovalada con 3.5-5 cm de diámetro o más. En su interior presenta semillas pequeñas, ovales. Son de color verde oscuro al principio pasando a verde amarillento o amarillo en la madurez. Su piel es delgada y se rompe fácilmente (Figura 2b). La pulpa es verdosa, jugosa, muy ácida. Es el tipo de limón más comercializado y producido en México siendo Michoacán el primer estado productor seguido de Colima y Oaxaca (13).

Limón eureka o italiano (C. limón): De origen híbrido, este fruto se caracteriza por ser de gran tamaño, oblongo y tener una forma elíptica. La piel es de espesor moderado y suele

ser lisa con ligeras arrugas. La pulpa del fruto tiene un color amarillo verdoso y un sabor muy tierno y ácido. Los frutos maduros son de color amarillo brillante (Figura 2c). En su mayoría no tienen semillas. Es apreciada comercialmente debido a que es una variedad muy productiva y de rápida entrada en fructificación. Produce frutos durante todo el año, pero el rendimiento principal se produce desde finales del invierno hasta principios del verano. En México esta variedad es cultivada en los estados de Tamaulipas, Yucatán, San Luis Potosí, Colima y Nuevo León (14).



Figura 2: Imagen de a) limón persa (*Citrus latifolia Tan.*), b) limón agrio o mexicano (*Citrus x aurantiifolia*), c) limón italiano (*C. limón*)

4.2. METABOLÓMICA

Se define a la metabolómica como la disciplina encargada de la identificación y cuantificación sistemática e integral de los metabolitos (compuestos de bajo peso molecular originados de las distintas reacciones químicas y enzimáticas de los sistemas biológicos) que se encuentran presentes en una muestra biológica o en un organismo dado. Permite medir la respuesta a diversos estímulos biológicos, genéticos, ambientales o patológicos (15–17).

En metabolómica existen diversos enfoques de estudio, ya sea mediante análisis dirigidos y no dirigidos (18–20). Los estudios dirigidos están orientados a realizar análisis cualitativos y cuantitativos de un grupo determinado de metabolitos presentes en una muestra. La identificación precisa de los metabolitos generalmente está predeterminada por la interrogante científica a resolver y es posible gracias a la existencia y disponibilidad de bases de datos y softwares. Este enfoque es especialmente útil cuando el objetivo está basado en la investigación de procesos metabólicos particulares (21,22). Por otro lado, en los estudios no dirigidos se busca identificar un conjunto de metabolitos, proporcionando un perfil metabolómico mediante la medición y comparación de tantas señales como sea posible. El grupo de datos resultantes funcionan como variantes de entrada en análisis estadísticos, logrando así, evidenciar la clasificación de las muestras analizadas y aquellos metabolitos responsables de las diferencias entre grupos. La clasificación de las muestras de acuerdo

con sus patrones metabolómicos depende de condiciones específicas, como aquellas relacionadas con el ambiente o factores externos. Este enfoque es frecuentemente utilizado cuando se busca realizar una investigación exploratoria o identificar nuevos biomarcadores de los perfiles metabólicos estudiados (22).

De esta forma, la metabolómica permite, con ayuda de técnicas analíticas, la diferenciación entre grupos de muestras y visualización de tendencias o patrones mediante el uso de modelos estadísticos (23).

4.2.1. METABOLÓMICA APLICADA A LOS ALIMENTOS

Entre las aplicaciones de la metabolómica se encuentra el estudio de los alimentos a nivel molecular, de composición o nutrientes, rama de estudio conocida como “foodomics” (24).

Esta disciplina surge como una herramienta para la solución de problemas en la calidad, origen e inocuidad de los alimentos (25), como son el surgimiento de patógenos alimenticios (26,27), adulteración (28), evaluación de riesgos en alimentos genéticamente modificados (29), detección de contaminación química (30), control de procesos industriales y su efecto en los alimentos (31), trazabilidad (32), autenticidad (33), entre otros (34,35).

4.2.2 PLATAFORMAS ANALÍTICAS EN METABOLÓMICA

Existen numerosas plataformas analíticas utilizadas en metabolómica como son la espectroscopía de RMN, espectroscopía de Infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) y la espectroscopía de masas (EM), la cual suele venir acoplada con alguna técnica de separación como puede ser la cromatografía de gases o cromatografía de líquidos (36,37).

Entre las técnicas más usadas se encuentran la EM y la RMN. Mientras que la metabolómica basada en la EM ofrece una alta selectividad y sensibilidad en la identificación y cuantificación de metabolitos, también involucra una preparación previa de muestra que puede ser muy laboriosa (38). Por otro lado, pese a su baja sensibilidad, la RMN resulta ser altamente reproducible, con alto rendimiento, no destructiva, universal y con una mínima preparación de muestra, resultando una excelente técnica de análisis a pesar de su baja sensibilidad (22,39).

4.2.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La RMN es una técnica espectroscópica reconocida por sus diversas aplicaciones como la determinación y elucidación estructural de compuestos orgánicos, los estudios de dinámica molecular, el análisis de mezclas, etc.

Su fundamento se basa en la capacidad que tienen los núcleos de múltiples elementos isotópicos con espín impar de protones o neutrones ($\mu \neq 0$) de absorber energía

electromagnética en el rango de las radiofrecuencias (rf) al ser sometidos a un campo magnético externo (B_0).

En ausencia del campo los espines se encuentran orientados de manera aleatoria (Figura 3a). Cuando se aplica un campo magnético estático (B_0) los dipolos se alinean en la dirección del campo, sin embargo, los espines pueden adoptar dos configuraciones distintas: estado de alta energía (espín β) donde los vectores del campo y del dipolo son antiparalelos y el estado de baja energía (espín α) en donde los vectores del campo y del dipolo son paralelos (Figura 3b). La diferencia de energía entre estos estados depende de la fuerza del campo magnético aplicado y es muy pequeña traduciéndose en una baja sensibilidad de la técnica. El grado en que un estado de energía se ve favorecido sobre otro obedece a la distribución de Boltzman (Ecuación 1).

$$N^- = N^+ e^{\frac{-\Delta E}{K_B T}}$$

Ecuación 1. Distribución de Boltzmann. En donde N^- es el número de espines en estado de mayor energía, N^+ es el número de espines en estado de menor energía, ΔE es la diferencia de energía entre los estados, K_B es la constante de Boltzman cuyo valor es $1.38066 \times 10^{-23} \text{ kgm}^2\text{K}^{-1}\text{s}^{-2}$ y T es la temperatura.

El espín de los núcleos presenta un movimiento de precesión a una frecuencia proporcional al campo magnético aplicado conocida como “frecuencia de Larmor” la cual está en función del campo magnético aplicado (B_0) y de la constante giromagnética propia para cada núcleo. (Ecuación 2).

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

Ecuación 2. Frecuencia de Larmor. En donde B_0 es el campo magnético que experimenta cada núcleo y γ es la constante giromagnética la cual es directamente proporcional al momento magnético de la del núcleo.

Cuando se emite una onda electromagnética en forma de pulso de radiofrecuencia (rf) que coincide con la frecuencia de precesión de los núcleos, estos captarán dicha energía y ocurrirá una transición del estado de baja energía al estado de alta energía y viceversa, fenómeno conocido como “resonancia” (Figura 3c). La energía es emitida cuando la onda cesa y esta es registrada aportando información relevante del entorno químico de los núcleos estudiados (40). De la relajación de los núcleos se obtiene el espectro de intensidad en función del tiempo conocido como decaimiento de la inducción libre (FID) el cual contiene toda la información en un experimento de RMN con contribuciones de muchos núcleos diferentes (Figura 3d). El espectro habitual de RMN en el dominio de la frecuencia se obtiene aplicando la transformada de Fourier a la FID (40,41) (Figura 3e).

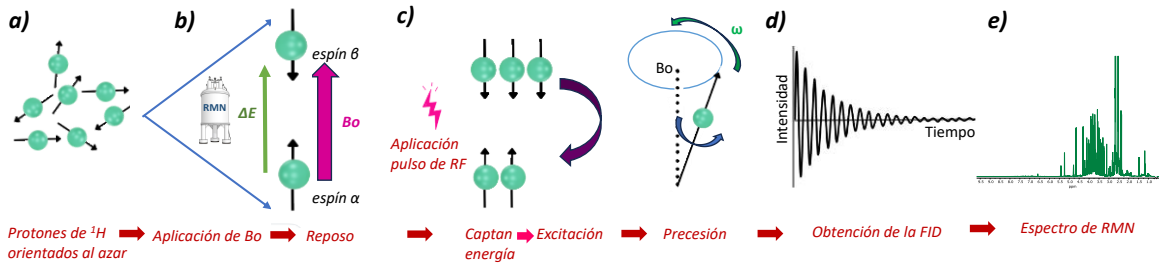


Figura 3: Fases del experimento de RMN. a) Espines nucleares orientados al azar. b) Orientación de los espines nucleares (estados α y β) en presencia de B_0 . c) Aplicación de pulso de rf. d) Adquisición de la FID. e) Espectro de RMN.

Los componentes fundamentales del espectrómetro de RMN son (23):

1. Imán superconductor que genera el B_0 .
2. Sonda con bobinas para la transmisión y detección de los pulsos rf.
3. Computadora para procesamiento de información.

De un espectro de ^1H -RMN es posible extraer información relevante acerca de la muestra de estudio mediante distintos parámetros de las señales como son el desplazamiento químico (δ), el acoplamiento espín-espín y el área bajo la curva.

El desplazamiento químico (δ) se define como la posición relativa de los picos de los núcleos en el eje horizontal del espectro. Dado que la densidad de electrones alrededor del núcleo produce efectos de protección/desprotección, diferentes tipos de núcleos (alifáticos, aromáticos o aldehídicos) se presentan en diferentes rangos de desplazamientos químicos por lo que es posible extraer información acerca de los grupos funcionales presentes.

En un espectro de RMN las intensidades de la señal son directamente proporcionales al número de núcleos equivalentes que la generan, debido a que todos los coeficientes de absorción para un núcleo determinado son idénticos. Por ello, es posible conocer el número de átomos de hidrógeno equivalentes mediante la integración del área bajo el pico de una señal de protón.

El acoplamiento espín-espín se debe a la capacidad que tienen los espines nucleares de interactuar entre sí a través de los electrones de enlace, lo cual da lugar al desdoblamiento de las señales. La relación entre el acoplamiento de dos núcleos y la multiplicidad de las señales se puede explicar teniendo en cuenta todos los posibles espines individuales de los protones. De todas las permutaciones de espines posibles, la multiplicidad o número de picos de una señal, viene dada por la regla $n+1$, donde n es el número de protones equivalentes que desdoblan una señal. A las distancias entre picos de

los multipletes se les denomina como constante de acoplamiento (J) y proporcionan gran información estructural (42,43).

Una secuencia de pulsos se define como el conjunto de pulsos específicos de radiofrecuencia, retardos y gradientes de campo magnético aplicados a una muestra con el fin de adquirir los experimentos de RMN (44).

Considerando la naturaleza, la complejidad y el alto contenido de agua en las muestras de jugos, es necesaria la supresión de la señal del agua en los espectros de RMN (señal más intensa) para poder observar las señales de los metabolitos que están en menor concentración y así evitar la pérdida de información.

Para la supresión de la señal de agua en los espectros existen distintas secuencias de pulsos que cumplen con este fin como son: excitation sculpting, WET, presaturación, watergate, purge, entre otras (45,46). Una de las más usadas para estudios de metabolómica es la secuencia 1D NOESY-presat (noesygppr1d, Bruker BioSpin) debido a la eficiente supresión de agua obteniendo espectros con una buena línea base (47,48).

4.3. METABOLÓMICA BASADA EN RMN DE CÍTRICOS

El auge en los últimos años que ha tenido el estudio metabolómico basado en RMN de muestras complejas dada su alta reproducibilidad y robustez ha dado lugar al análisis de productos agroalimentarios como es el caso de los cítricos y sus jugos. Existen reportados diversos análisis basados en dicha técnica con diferentes objetivos, por ejemplo, análisis de control de calidad (49–51), autenticidad del producto (52), identificación de biomarcadores (53,54), estudio de patógenos e infecciones (55,56), evaluación de procesos industriales (49,50,57), entre otros.

Uno de los principales enfoques de los estudios es la discriminación de las muestras por su origen geográfico. Como ejemplo, lograron la diferenciación de jugos de naranja producidos en distintas regiones del territorio argentino (58). También evidenciaron la alta influencia que tiene los distintos tipos de suelo de cultivo (59). Con respecto a los cítricos mexicanos, hay un estudio en el que se obtuvo el perfil metabolómico de jugo de naranja, mandarina, limón y toronja cultivados en el estado de Veracruz, dando lugar a la identificación de metabolitos característicos de cada especie (60).

Hasta donde sabemos, no existe un estudio de limones mexicanos en función su origen geográfico o de la variedad de especie, objeto de estudio del presente proyecto cuya relevancia radica en el gran papel que tiene México en el cultivo y comercialización de estos productos agroalimentarios.

4.4 QUIMIOMETRÍA

La gran cantidad de datos obtenidos en los espectros de RMN al analizar mezclas complejas, como en el caso de los jugos de cítricos, conlleva al uso de métodos quimiométricos capaces de reducir la dimensionalidad de los datos espectrales para su fácil interpretación y reconocimiento de patrones (61,62).

Se define a la quimiometría como aquella disciplina química, que, con el uso de la estadística, las matemáticas y otros métodos empleados de forma lógica, logra extraer la máxima cantidad de información significativa de los datos disponibles (63,64).

Los métodos estadísticos multivariantes en quimiometría están divididos en dos categorías principales: las técnicas estadísticas no supervisadas y supervisadas (65). Las primeras, también conocidas como métodos exploratorios, tienen como objetivo establecer la existencia de grupos de muestras en la matriz de datos tomando en cuenta sus similitudes sin información previa de su existencia. Entre los más usados están el análisis de componentes principales (PCA), el análisis jerárquico de conglomerados (HCA) y el procedimiento de mapeo no lineal (NLM) (66,67). El más conocido es el análisis de PCA, el cual implica el cálculo de combinaciones lineales de las variables originales, con el fin de determinar aquellos valores atípicos (analíticos o biológicos) en el conjunto de datos y derivar aquellas características responsables de la diferenciación de clases (68).

Por otro lado, en los métodos supervisados previamente se conocen a las muestras pertenecientes a una clase o grupo particular. De esta forma, los espectros son tratados para resaltar una relación entre los datos y la clase considerada, teniendo como objetivo el establecimiento de modelos implícitos o explícitos mediante las combinaciones lineales ponderadas que minimizan la varianza dentro del grupo y la maximizan con respecto a otros (67,69). Entre los métodos más utilizados están el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y la proyección ortogonal a las estructuras latentes con análisis discriminatorio (OPLS-DA). El primero, modela la varianza dentro de un conjunto de datos que comparten una misma característica biológica con el fin de lograr la máxima discriminación estadística entre grupos (70,71). El segundo, aplica un filtro de corrección de señal ortogonal para facilitar la interpretación del modelo eliminando variaciones no correlacionadas y así, distinguir entre datos predictivos y no predictivos (62,72).

5. METODOLOGÍA

5.1. MUESTRAS

Durante el verano del 2023, se obtuvieron limones de tres variedades de diferentes regiones geográficas de México. 51 muestras de limón agrio (*Citrus x aurantiifolia*), provenientes de los estados de Nuevo León (3), Michoacán (9), Colima (10), Oaxaca (10), Guerrero (10) y Tamaulipas (9); 48 de limón persa (*Citrus latifolia* Tan) de los estados de Michoacán (9), Colima (10), Oaxaca (10), Hidalgo (9), Veracruz (10) y 30 de limón italiano (*C. limon*), provenientes de los territorios mexicano (10), argentino (10) y chileno (10). Los limones fueron seleccionados de acuerdo con una similitud en color, textura, tamaño y peso, y fueron almacenados bajo refrigeración en bolsas de red que permitieran su ventilación a 8-10°C hasta su análisis por RMN.

5.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de jugo de limón fueron obtenidas mediante una extracción manual, evitando la presencia de sólidos propios de la muestra. Se centrifugaron 1.5 mL del jugo extraído en un tubo Eppendorf (4°C, 10000 rpm, 15 min) y se dejó en reposo durante 30 minutos. A 600 µL del sobrenadante se le adicionaron 100 µL de solución de TSP en D₂O (0.4%) y se ajustó el pH a 7.00 con DCl/NaOD concentrados. Una vez ajustado el pH de la muestra, se completó el volumen a 1 mL con D₂O. Finalmente, se transfirieron 600 µL de la disolución a un tubo de RMN de 5 mm para obtener el espectro de ¹H-RMN.

5.3. ADQUISICIÓN DE EXPERIMENTOS DE RMN

Los experimentos de RMN se realizaron a 300 K en un espectrómetro Bruker Avance III HD de 16.44 Teslas (frecuencia para ¹H 699.96 MHz) equipado con una sonda criogénica de triple sintonía de 5mm y un automuestreador "Sample Jet" (Figura 4).



Figura 4: Espectrómetro Bruker Avance III de 16.44 Tesla (700 MHz para ^1H).

Los espectros de ^1H -RMN se adquirieron con la secuencia de pulsos *noesygppr1d* con presaturación de la señal del agua con los siguientes parámetros: retardo entre pulsos (D1): 4s, tiempo de adquisición (AQ): 2.32 s, número de transientes (NS): 32, número de transientes ficticios (DS): 4, ventana espectral (SW): 18 ppm y ganancia del receptor (RGA): 16. La adquisición de los espectros se llevó a cabo de manera automática con el software IconNMR (Bruker).

5.4. PROCESAMIENTO DE ESPECTROS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesamiento de espectros se realizó con el software TopSpin 3.5 (Bruker). Las FIDs fueron multiplicadas por una función exponencial con un ancho de línea de 0.3 Hz. La corrección de fase se hizo de manera automática y la línea base aplicando una función polinomial de grado 5. Los espectros se referenciaron a la señal de TSP (0.0 ppm).

Utilizando el software Chenomx 8.4 (Chenomx NMR Suite, Canadá) se realizó una reducción de dimensionalidad por generación de cajas homogéneas (binning) con un tamaño de 0.04 ppm en la región de -0.18 -10.02 ppm, dando un total de 255 cajas. Se normalizó al total de área excluyendo la región de la señal residual del H_2O (4.7-4.9ppm) y la del TSP (-0.18 a -0.6 ppm). La matriz se exportó al programa SIMCA 16.0 (Unimetrics, Suecia) y se incluyó una

columna con la clasificación de las muestras de acuerdo con su variedad y una segunda de acuerdo con su origen geográfico. Se realizaron análisis estadísticos multivariante PCA y OPLS-DA. Para todos los modelos realizados se utilizó escalado Pareto.

5.5. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Para la identificación de metabolitos se utilizó el software de reconocimiento de patrones Chenomx NMR Suit, datos reportados en la literatura y el Human Metabolome Data Base (HMDB) considerando los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y la multiplicidad.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN LOS ESPECTROS DE ^1H -RMN

En la Figura 5 se muestra un espectro representativo de ^1H -RMN jugo de limón con la asignación de 31 metabolitos identificados. En la región de 0.0-3.0 ppm, correspondiente a ácidos orgánicos y aminoácidos, se identificaron el ácido cítrico, málico y malónico. El ácido cítrico aparece como un sistema AB a 2.60 ppm y es el ácido orgánico más abundante en esta región. Los aminoácidos presentes son valina, leucina, isoleucina, arginina, prolina, alanina glutamina y treonina. Otros compuestos identificados en esta región fueron γ -amino butirato y etanol.

En la región de 3.0-5.5 ppm, se observó un gran número de señales solapadas asociadas a carbohidratos como sacarosa, α -glucosa, β -glucosa y fructosa. Las señales de baja intensidad por 3.28 ppm son atribuidas al myo-inositol, mientras que el doblete del ácido ascórbico se observó a 4.52 ppm.

En la región de 5.5-10 ppm se observaron señales de baja intensidad correspondientes a aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos como fenilalanina, trigonelina, ácido fórmico, ácido gálico y acetaldehído. La señal más intensa en esta región es la del ácido aconítico.

En la Tabla 1 se enlistan los metabolitos identificados junto con el desplazamiento químico (δ), la multiplicidad y la constante de acoplamiento (J) de las señales utilizadas para su identificación.

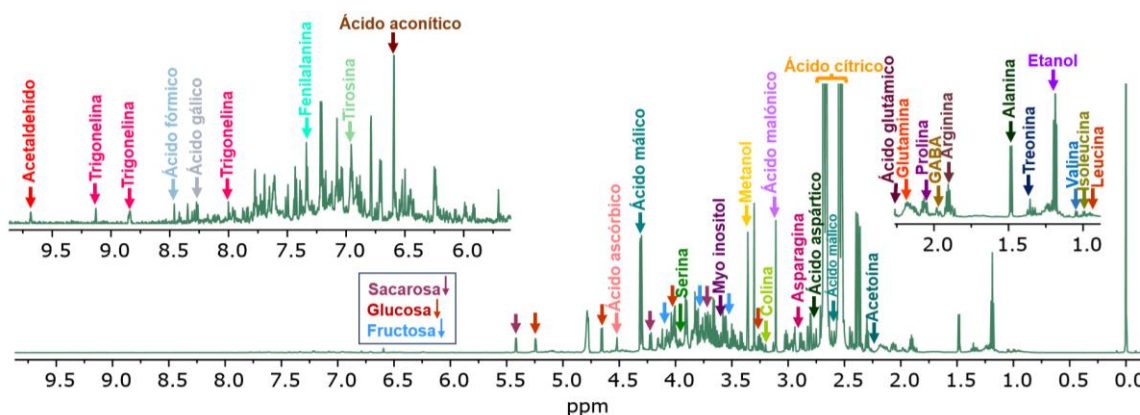


Figura 5: Espectro de ^1H -RMN (700 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 300 K) de una muestra de jugo de limón a $\text{pH}=7$ con la asignación de 31 metabolitos. Se muestran las ampliaciones de la región aromática y ácidos orgánicos.

Tabla 1: Metabolitos identificados en las muestras de jugo de limón.

Familia química	Metabolito	Desplazamiento químico (δ ppm, multiplicidad, $J=Hz$)
Ácidos orgánicos	Ácido cítrico	2.60(dd, 15.21, 94.76)
	Ácido fórmico	8.46(s)
	Ácido aconítico	6.59(s), 3.45(d, 0.82)
	Ácido aspártico	2.81(dd, 3.81, 17.45)
	Ácido glutámico	2.04(m)
	Ácido málico	2.38(dd, 10.10, 15.39), 4.31(dd, 3.10, 10.03)
	Ácido malónico	3.1(s)
	Ácido gálico	7.21(d, 8.31)
Alcoholes	Etanol	1.19(t, 7.09, 7.09), 3.66(q, 6.72, 6.72, 6.27)
	Metanol	3.36(s)
Vitaminas	Ácido ascórbico	3.70(d, 2.02), 3.75(m), 4.52(d, 1.95)
	Colina	3.20(s)
Aminoácidos	Alanina	1.48(d, 7.22), 3.79(q, 7.05, 7.05, 7.14)
	Arginina	1.88(m), 1.66(m)
	Asparagina	2.87(dd, 4.72, 17.81), 2.95(m), 4.00(m)
	Fenilalanina	2.87(dd, 7.52, 16.81), 7.30(m), 7.39(m), 7.43(t, 7.44, 7.44)
	GABA	2.30(t, 7.42, 7.42)
	Glutamina	2.06(m)
	Isoleucina	1.01(d, 7.01), 1.24(m)
	Prolina	2.02(m), 2.18(m), 2.33(m), 3.33(m), 3.40(m)
	Serina	3.95(m)
	Tirosina	6.95(m), 7.20(m)
	Treonina	1.33(d, 6.68), 4.24(m)
	Leucina	0.95(d, 8.32), 1.7(m)
	Valina	1.05(d, 7.03), 0.99(d, 7.00), 2.7(m)
Carbohidratos	Fructosa	3.55(m), 3.62(d, 1.98), 3.83(m), 4.01(m), 4.10(s), 4.11(m)
	Glucosa	3.25(dd, 7.98, 9.45), 3.42(m), 3.55(m), 3.82(m), 3.9 (dd, 3.32, 11.86), 4.65(d, 7.94), 5.24(d, 3.76)
	Sacarosa	3.45(m), 3.55(dd, 3.82, 9.79), 3.77(dd, 5.35, 12.41), 3.88(m), 4.06(t, 8.66, 8.66), 4.22(d, 8.77), 5.42(d, 3.86)
	Myo-Inositol	3.28(m), 3.52(m), 3.63(m), 4.07(m)
Otros	Acetoína	2.23(s)
	Trigonelina	4.44(s), 8.01(m), 8.84 (m), 9.13(s)
	Acetaldehído	2.25(d, 2.94). 9.68(q, 2.80, 2.80, 2.76)

6.2. ESPECTROS DE ^1H -RMN DE JUGO DE LIMÓN

En la Figura 6 se muestran espectros representativos de las muestras de jugo de limón de las tres variedades estudiadas. Observando estos espectros se puede notar que en la región alifática (δ 0.0–3.0 ppm), los jugos de limón persa presentan una señal más intensa del ácido cítrico (señal que se sale de la ventana de la imagen), mientras que la señal del etanol es menor en los limones italianos. En cuanto a las señales de los carbohidratos (δ 3.0-5.5 ppm) son similares en las tres variedades a excepción de una disminución de myo-inositol en las muestras de variedad Italiano. En la región aromática se distingue una mayor intensidad en las señales de la fenilalanina y ácido aconítico en las muestras de jugo de limón italiano y una ausencia de la señal de tirosina en el jugo de limón persa.

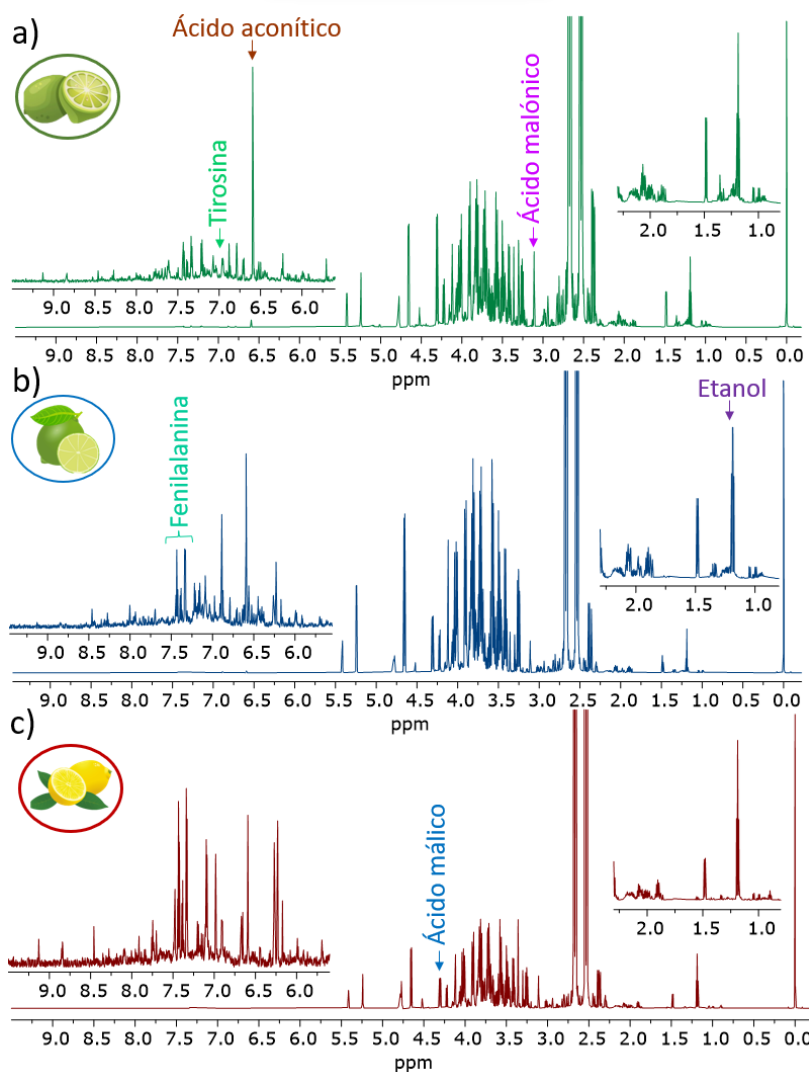


Figura 6: Espectros ^1H -RMN (700 MHz, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$, 300 K) con ampliaciones. a) Muestra de jugo de limón agrio, b) Muestra de jugo de limón persa y c) Muestra de jugo de limón italiano.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

6.3.1 VARIEDAD DE ESPECIE

Se examinaron un total de 129 muestras, con el propósito de saber si existe una diferenciación con base en la variedad de especie.

Inicialmente se usó el análisis exploratorio PCA (Figura 7) para discriminar posibles valores anómalos, evaluar variaciones y encontrar posibles patrones en el conjunto de datos. El modelo resultante reveló una clara separación con una variación espectral del 92%, donde el PC1 describe el 85.4% de la variación espectral, el PC2 el 4.43% y el PC3 el 2.7%; con valores de ajuste $R^2X=0.989$ y una bondad de predicción de $Q^2=0.968$. El resultado muestra que el modelo permite la discriminación entre las muestras, agrupándose en tres grupos distintos de acuerdo con la variedad a la que pertenece (persa, agrio e italiano). La mayoría de las muestras se colocaron dentro de los límites de confianza de la prueba de Hotelling's T^2 (95%) a excepción de 9 muestras anómalas. Las 9 muestras no fueron excluidas del análisis estadístico puesto que eliminarlas no mejora los valores del modelo.

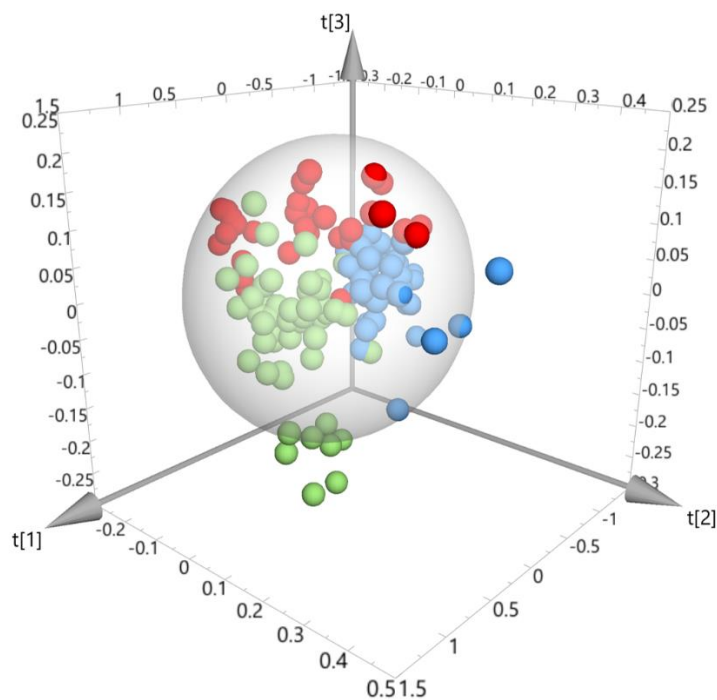


Figura 7: Gráfico PCA (PC1 vs PC2 vs PC3) de los datos espectrales de ^1H RMN de jugo de limón coloreados en función de su variedad. 51 muestras de tipo agrio (verde), 48 muestras de tipo persa (azul) y 30 muestras de jugo de tipo italiano (rojo). La varianza explicada se informa para cada componente principal y la elipse representa un límite de confianza del 95% donde se do9 valores atípicos.

Posteriormente, se evaluó la diferenciación en los espectros asociada a la variedad a la que pertenecen las muestras mediante el método supervisado OPLS-DA (Figura 8). 98.4% de la variación espectral (R^2X) y 93.4% de la variación del grupo (R^2Y) fue capturada en un modelo de 2+8+0 variables latentes, mientras que la bondad de la predicción fue de 0.892 (Q^2) consiguiendo una clara discriminación entre los jugos de limón de distintas variedades. De este modelo se establecieron los bins responsables de la discriminación entre las variedades de especie a partir de la importancia de las variables de proyección (VIP), considerando un punto de corte de $VIP > 1.0$ (Figura 9). Se identificaron los metabolitos correspondientes a dichos bins, los cuales son carbohidratos: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol; ácidos orgánicos: ácido málico, ácido ascórbico, ácido malónico, ácido cítrico y otros compuestos como serina, etanol, treonina y prolina. Se destacan niveles significativamente mayores de ácido cítrico en el jugo de limón persa en comparación con los jugos de limón de la variedad italiano y agrio.

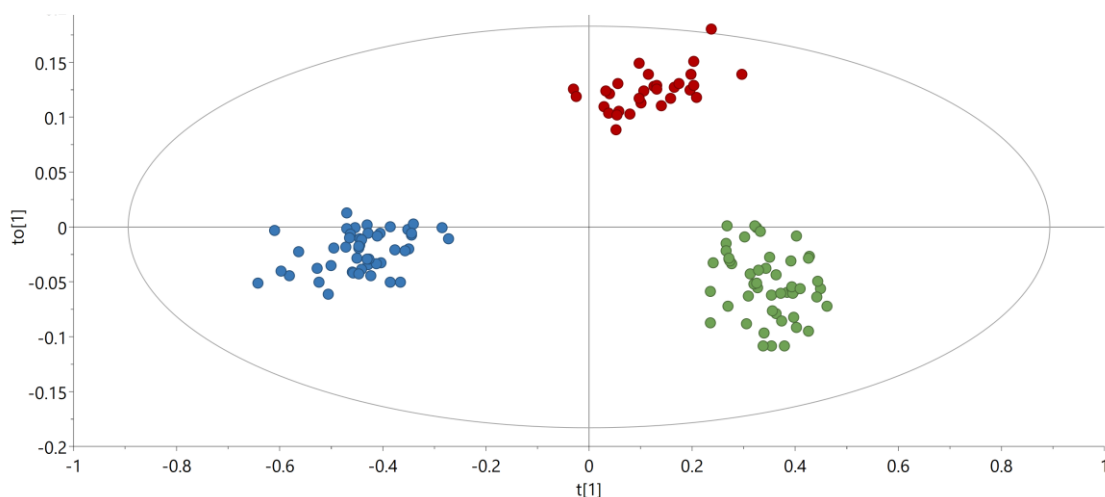


Figura 8. Gráfico OPLS-DA de datos espectrales de 1H RMN de jugo de limón. Se presentan 129 muestras de distintas variedades: 51 muestras de tipo agrio (verde), 48 muestras de tipo persa (azul) y 30 muestras de jugo de tipo italiano (rojo).

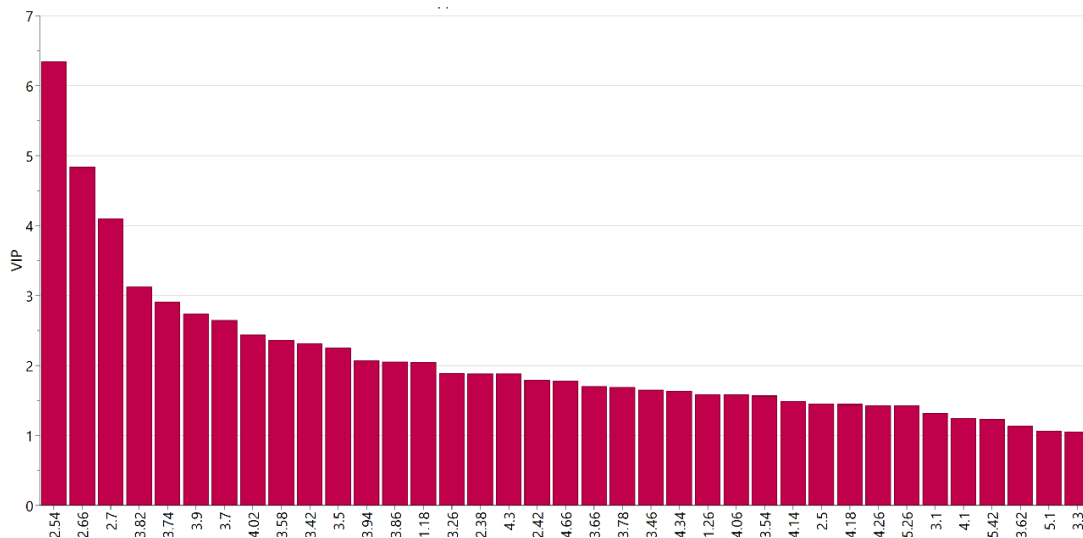


Figura 9: VIP>1.0 del modelo OPLS-DA de 129 muestras de jugo de limón de tres variedades distintas (persa, italiano y agrio).

Tabla 2: Metabolitos identificados como señales potenciales para la discriminación de jugo de limón en función de su variedad (VIP >1.0).

Metabolito	Bin
Sacarosa	5.42, 4.26, 4.18, 4.06, 3.90, 3.86, 3.82, 3.78, 3.70, 3.62, 3.58, 3.54, 3.50
Glucosa	5.26, 4.66, 3.94, 3.90, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.70, 3.58, 3.54, 3.50, 3.46, 3.42, 3.30, 3.26
Ácido Málico	4.34, 2.42, 2.38
Fructosa	4.14, 4.06, 4.02, 3.94, 3.90, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.70, 3.62, 3.58
Myo-inositol	4.1, 3.66, 3.62, 3.58, 3.54, 3.30
Ácido ascórbico	4.06
Serina	3.94
Etanol	3.66, 1.18
Ácido malónico	3.1
Ácido cítrico	2.7, 2.66, 2.54, 2.50
Prolina	2.38
Treonina	1.36
NI	1.18
NI	5.1
NI	4.30
NI	4.18
NI	2.42

Al analizar que la región de los carbohidratos es la que tiene una mayor contribución en la separación de las muestras, se realizaron análisis PCA y OPLS-DA considerando las regiones de 0-3 ppm, 3-5.5 ppm y 5.5-10 ppm (Figura 10) para identificar otros metabolitos responsables de la discriminación de las muestras por variedad en cada una de dichas regiones.

La Figura 10a-c muestran los análisis exploratorios PCA (PC1/PC2) derivados de los espectros de ^1H -RMN de las muestras de jugo de limón para visualizar las separaciones entre las muestras tomando en cuenta únicamente ciertas regiones del espectro. El modelado PCA de la región de ácidos orgánicos y aminoácidos (Figura 10a, 0-3 ppm), azúcares y carbohidratos (Figura 10b, 3-5.5 ppm) y aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos (Figura 10c, 5.5-10 ppm) reveló valores de R^2X y Q^2 de 0.976 y 0.905, 0.985 y 0.921, y 0.941 y 0.731, respectivamente.

El modelo PCA de la región de 0-3 ppm (Figura 10a) muestra 4 valores anómalos y el OPLS-DA (Figura 10d) señala una clara separación entre las tres variedades. Se identificaron los metabolitos que contribuyen a la separación considerando un punto de corte de $\text{VIP}>1.0$. Se atribuyó la separación a los siguientes metabolitos: ácido málico, treonina, etanol y prolina; sin embargo, destaca el ácido cítrico como principal biomarcador entre las muestras cuya intensidad de señal es contrastantemente alta en el jugo de limón persa en comparación con los limones tipo italiano y agrio respectivamente.

El modelo PCA de la región 3-5.5 ppm (Figura 10b) presenta 5 valores anómalos y el OPLS-DA (Figura 10e) muestra una notable separación entre las tres variedades. Se identificó a los metabolitos que contribuyeron a la separación considerando un punto de corte de $\text{VIP}>1.0$. Se le atribuyó la separación de las muestras a niveles notablemente altos de los principales azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa en las muestras de jugo de limón agrio, en contraste con los bajos niveles a los que se encuentran dichos metabolitos en las muestras de jugo de limón persa. Además, se encontró una menor presencia de los compuestos myo-inositol y etanol en el jugo de limón italiano.

El modelo PCA de la región 5.5-10.0 ppm (Figura 10c) muestra una separación por el PC1 con superposición de las muestras, lo que resulta en una baja previsibilidad indicada por el valor de Q^2 (0.731). El OPLS-DA complementario (Figura 10f) muestra una notable separación entre las tres variedades. Se identificó a los metabolitos que contribuyeron a la separación considerando un punto de corte de $\text{VIP}>1.0$. Entre los metabolitos identificados se encuentran la fenilalanina y el ácido aconítico cuya intensidad de señales aumenta en las muestras de jugo de limón italiano. Por otro lado, se observó la ausencia de tirosina en el jugo de limón persa, mientras que el ácido gálico tiene una significativa disminución en sus niveles en dicho tipo de jugo.

En conclusión, en todos los casos se consiguieron mejores valores predictivos al analizar toda la región del espectro, sin embargo, enfocar el análisis quimiométrico a las regiones independientes permitió realizar el análisis de los metabolitos en cada una.

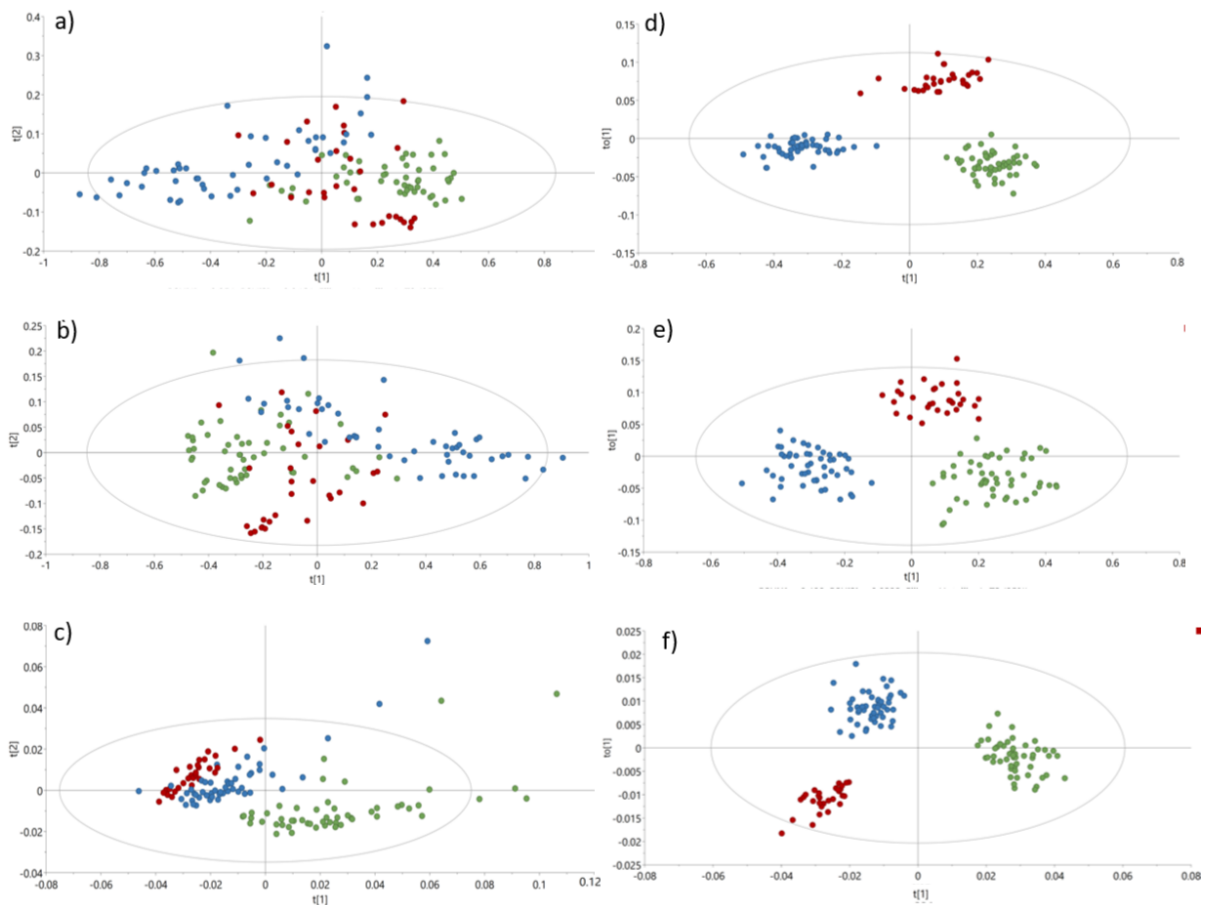


Figura 10: Scores de PCA (a-c) y OPLS-DA (d-f) de los espectros de ^1H RMN de jugo de limón: 51 agrio (verde), 48 persa (azul) y 30 italiano (rojo). Región de 0-3 ppm (a,d), región de 3.0-5.5 ppm(b,e) y región de 5.5-10 ppm(c, f).

6.3.2 ORIGEN GEOGRÁFICO

Para el análisis por origen geográfico, el estudio se limitó a las regiones de las cuales se disponía de una cantidad de limones igual o superior a 9, que eran en total 79, incluyendo 10 muestras de Argentina, 10 de Chile, 20 del estado de Colima, 9 del estado de Michoacán, 20 del estado de Oaxaca y 10 del estado de Veracruz.

Se usó el modelo estadístico no supervisado PCA para discriminar posibles valores anómalos, evaluar variaciones y encontrar posibles patrones en el conjunto de datos (Figura 11). El modelo resultante tiene valores de ajuste $R^2X=0.991$ y una bondad de predicción de $Q^2=0.961$ con 2PCs; donde el PC1 describe el 86.2% de la variación espectral, mientras que

el PC2 describe el 3.7%. El resultado muestra que el modelo no presenta ninguna discriminación entre las muestras. Los 3 valores atípicos no fueron excluidos de los análisis subsecuentes puesto que eliminarlos no mejora de manera significativa los valores del modelo.

Con el fin de encontrar la variación en los espectros asociada a la región geográfica a la que pertenecen las muestras y determinar una posible correlación entre los datos espectrales se utilizó el modelo supervisado OPLS-DA (Figura 12). El modelo de 5+2+0 variables latentes, no consigue una discriminación entre las muestras teniendo bajos niveles de predictibilidad con una bondad de predicción (Q^2) de 0.546 y valores de ajuste R^2X y R^2Y de 0.977 y 0.634 respectivamente.

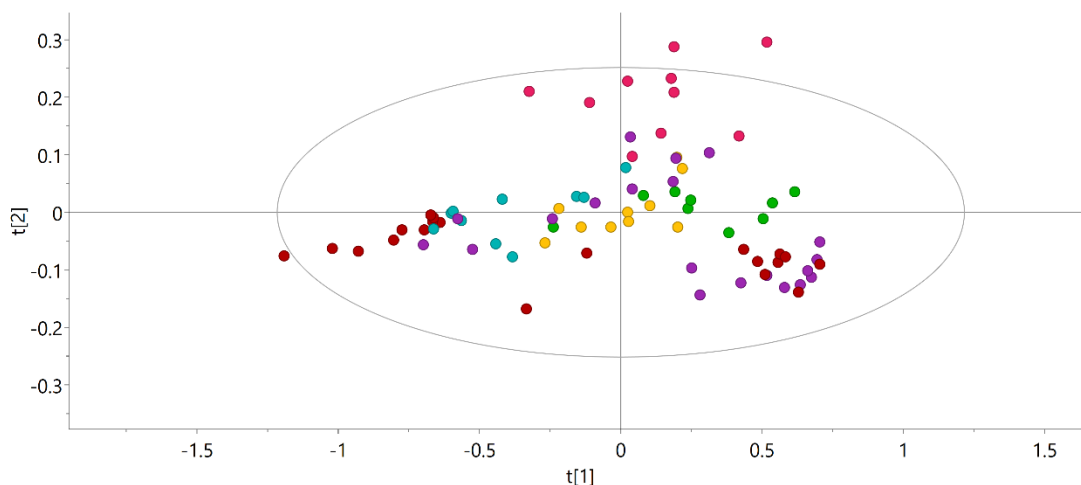


Figura 11: Gráfico PCA (PC1 vs PC2) de datos espectrales de ^1H RMN de jugo de limón coloreados en función de su origen geográfico. Se presentan 79 muestras de distintos orígenes geográficos: 10 de Argentina (rosa), 10 de Chile (amarillo), 20 de Colima (rojo), 9 de Michoacán (verde), 20 de Oaxaca (morado), y 10 de Veracruz (azul). La varianza explicada se informa para cada componente principal y la elipse representa un límite de confianza del 95% donde se observan 3 valores atípicos.

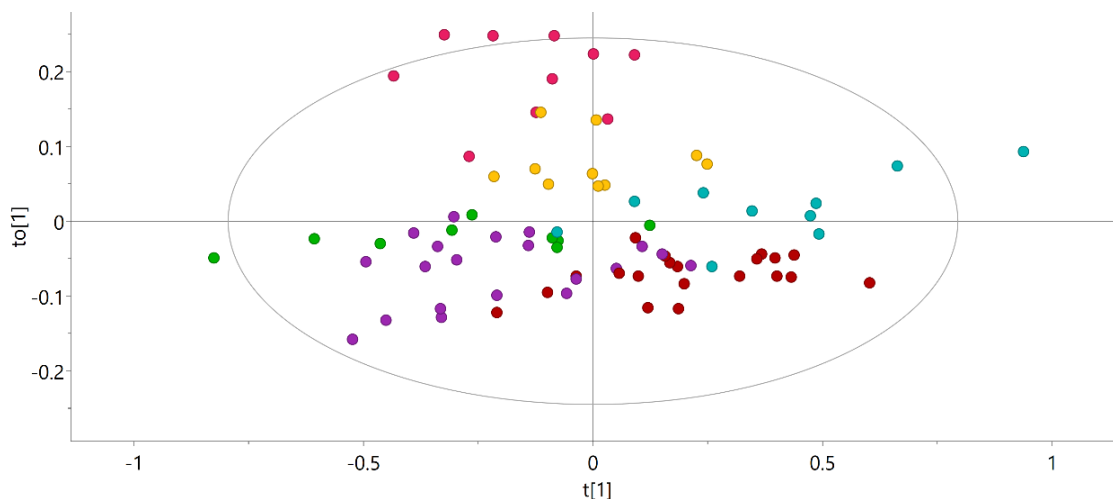


Figura 12: Gráfico OPLS-DA de datos espectrales de ^1H RMN de jugo de limón coloreados en función de su origen geográfico. Se presentan 79 muestras de distintos orígenes geográficos: 10 de Argentina (rosa), 10 de Chile (amarillo), 20 de Colima (rojo), 9 de Michoacán (verde), 20 de Oaxaca (morado), y 10 de Veracruz (azul).

El resultado del modelo OPLS-DA mostrado en la Figura 12 sugiere que las variaciones químicas detectadas no son lo suficientemente distintivas para discernir con certeza las diferencias geográficas entre las muestras analizadas. Por este motivo, se continuó el análisis de las muestras en función de su origen geográfico considerando únicamente muestras pertenecientes a la misma variedad.

6.3.2.1 ANÁLISIS DE ORIGEN GEOGRÁFICO DE JUGO DE LIMÓN ITALIANO

Para el análisis de jugo de limón italiano en función del origen geográfico se consideraron un total de 30 muestras provenientes de tres países: México (10), Argentina (10) y Chile (10).

El PCA (Figura 13a) tiene valores de ajuste de $R^2X=0.991$ y de predicción $Q^2=0.93$, con 2PCs; donde el PC1 describe el 75.3% de la variación espectral, mientras que el PC2 describe el 15.7%. El modelo presenta un valor atípico en la gráfica de Hotelling's T^2 , sin embargo, eliminar este dato no mejora la predictibilidad del modelo, por lo que se siguió considerando para análisis subsecuentes. El método supervisado OPLS-DA (Figura 13b) de 2+3+0 variables latentes fue capaz de capturar el 96.8% de la variación espectral (R^2X), el 91.4% de la variación del grupo (R^2Y) y la bondad de la predicción (Q^2) fue del 86% consiguiendo una clara discriminación entre los jugos de limón italiano de los 3 países. De este modelo se obtuvieron los bins responsables de la discriminación ($VIP>1.0$, Figura 14). Los metabolitos correspondientes a los bins seleccionados (Tabla 3), son los carbohidratos: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol; ácidos orgánicos: ácido málico, ácido succínico y ácido cítrico y otros compuestos como etanol y prolina. Al superponer los espectros de ^1H -

RMN, se observó una mayor intensidad de las señales de ácido cítrico en el jugo de limón italiano proveniente de Chile y Argentina en comparación con el jugo de limón italiano proveniente de México. Además, existe una menor intensidad de la señal de ácido málico en el jugo de limón italiano argentino en comparación con los otros dos orígenes geográficos.

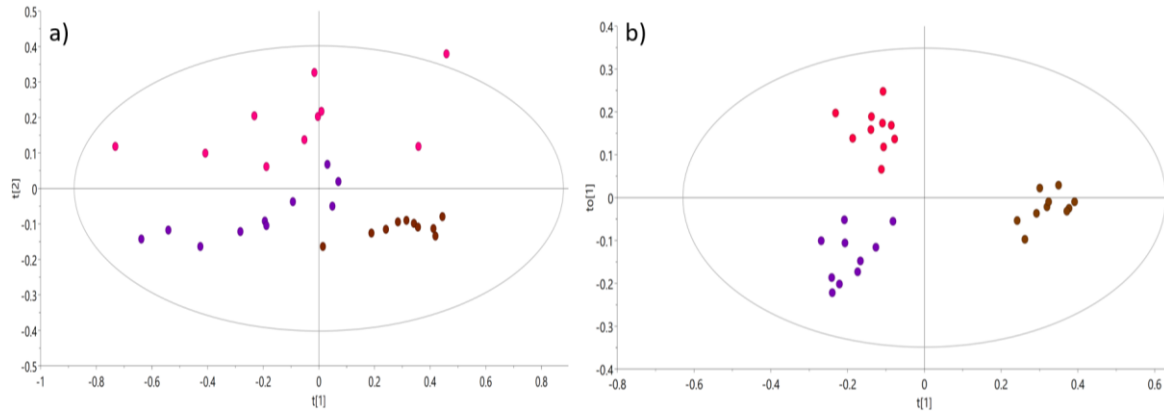


Figura 13: a) Scores del PCA y b) Scores del OPLS-DA de los datos espectrales de ^1H -RMN. Ambos modelos son de 30 muestras de jugo de limón italiano: 10 de Argentina (rosa), 10 de Chile (morado), 10 de México (café).

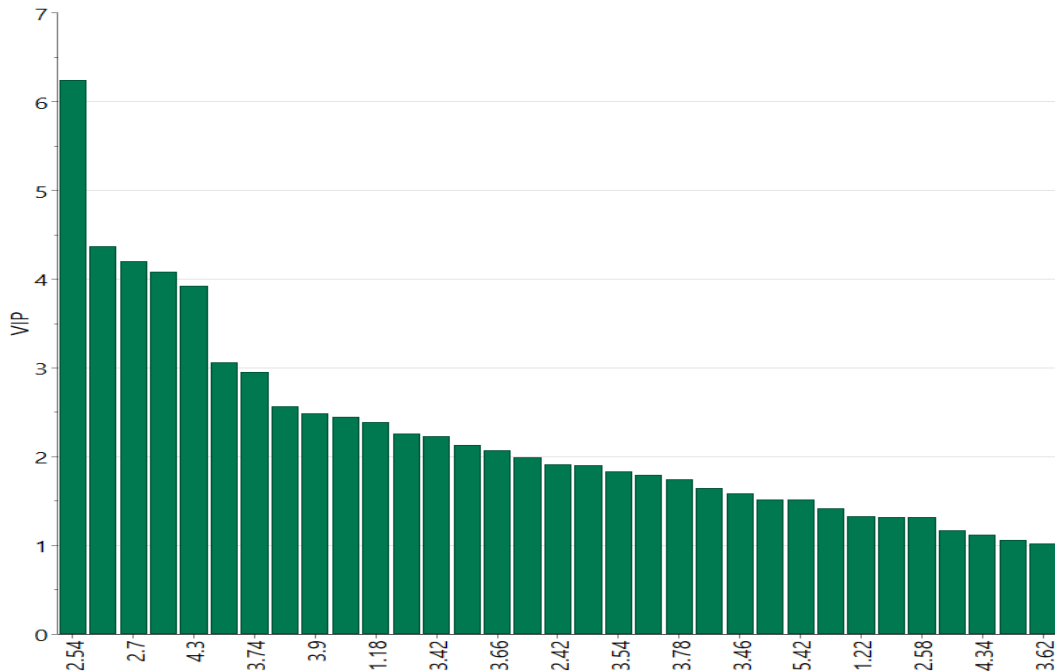


Figura 14: VIP>1.0 del modelo OPLS-DA de 30 muestras de jugo de limón italiano de México, Argentina y Chile.

Tabla 3: Metabolitos identificados en los VIP como señales potenciales para la discriminación de jugo de limón italiano de México, Argentina y Chile.

Metabolito	Bin
Sacarosa	5.42, 4.22, 4.06, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.70, 3.62, 3.58, 3.54, 3.50
Glucosa	5.26, 4.66, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.70, 3.58, 3.54, 3.50, 3.46, 3.42, 3.26
Ácido málico	4.34, 4.30, 2.42, 2.38
Fructosa	4.06, 4.02, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.70, 3.62, 3.58
Myo-inositol	4.1, 3.66, 3.62, 3.58, 3.54
Etanol	3.7, 3.66, 1.22, 1.18
Ácido cítrico	2.7, 2.66, 2.58, 2.54, 2.50
Ácido succínico	2.82
Prolina	2.38
NI	4.30
NI	4.18
NI	2.42

6.3.2.2 ANÁLISIS DE ORIGEN GEOGRÁFICO DE JUGO DE LIMÓN PERSA

Para el análisis de jugo de limón persa en función del origen geográfico se consideraron un total de 30 muestras provenientes de tres estados de la República Mexicana: Veracruz (10), Oaxaca (10) y Colima (10). El PCA (Figura 15a) resultante tiene valores de ajuste de $R^2X=0.973$ y de predicción $Q^2=0.946$, con 2PCs; donde el PC1 describe el 88.9% de la variación espectral, mientras que el PC2 describe el 3.98%. El modelo no presenta ningún valor atípico en la gráfica de Hotelling's T^2 . El método supervisado OPLS-DA (Figura 15b) de 2+2+0 variables latentes fue capaz de capturar el 96.8% de la variación espectral (R^2X), el 84.1% de la variación del grupo (R^2Y) y la bondad de la predicción (Q^2) fue del 72.8% consiguiendo una clara discriminación entre los jugos de limón persa de los 3 estados de la República Mexicana. De este modelo se obtuvieron los bins responsables de la discriminación ($VIP>1.0$, Figura 16), los cuales corresponden a carbohidratos: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol; ácidos orgánicos: ácido málico, ácido ascórbico y ácido cítrico y otros compuestos como etanol y prolina. Al superponer los espectros de 1H -RMN, se observó una mayor intensidad de las señales de ácido cítrico y prolina en el jugo de limón persa proveniente del estado de Colima en comparación con el jugo de limón persa proveniente de los estados de Oaxaca y Veracruz.

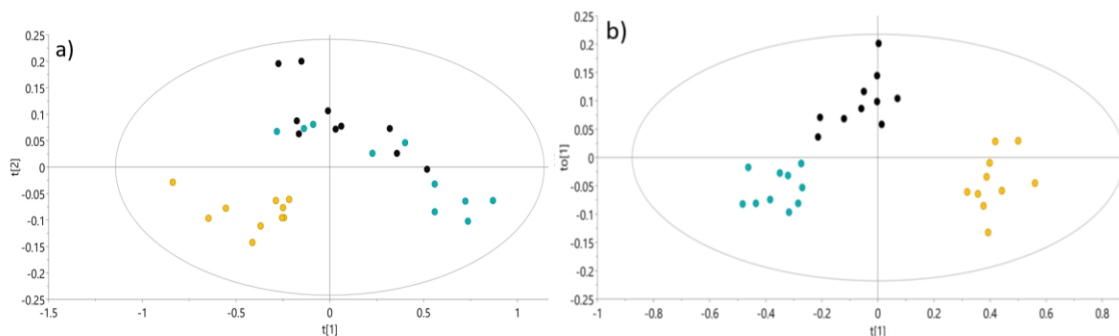


Figura 15: a) Scores del PCA y b) Scores del OPLS-DA de los datos espectrales de ¹H-RMN. Ambos modelos son de 30 muestras de jugo de limón persa: 10 del estado de Colima (amarillo), 10 del estado de Veracruz (negro) y 10 del estado de Oaxaca (azul).

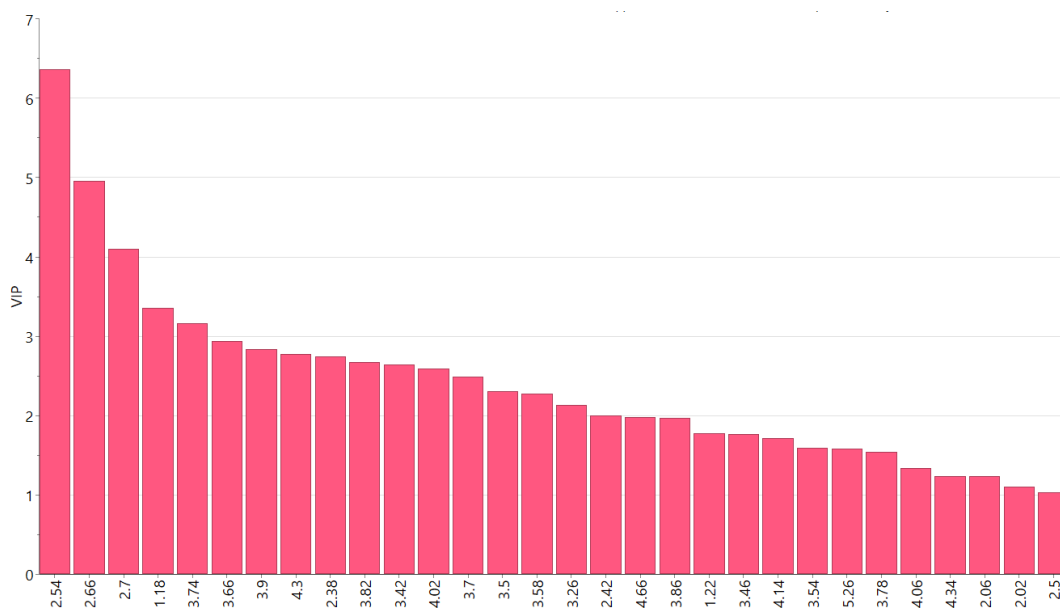


Figura 16: VIP>1.0 del modelo OPLS-DA de 30 muestras de jugo de limón persa de Colima, Veracruz y Oaxaca

Tabla 4: Metabolitos identificados en los VIP como señales potenciales para la discriminación de jugo de limón persa de Colima, Veracruz y Oaxaca.

Metabolito	Bin
Sacarosa	4.06, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.7, 3.58, 3.54, 3.50
Glucosa	5.26, 4.66, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.7, 3.58, 3.54, 3.50, 3.46, 3.42, 3.26
Ácido málico	4.34, 4.30, 2.42, 2.38
Fructosa	4.14, 4.06, 4.02, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.7, 3.58
Ácido ascórbico	4.06
Etanol	3.7, 3.66, 1.22, 1.18

Myo-inositol	3.66, 3.58, 3.54
Ácido cítrico	2.7, 2.66, 2.54, 2.50
Prolina	2.38, 2.06, 2.02
NI	4.30
NI	2.42

6.3.2.3 ANÁLISIS DE ORIGEN GEOGRÁFICO DE JUGO DE LIMÓN AGRIO

Para el análisis de jugo de limón agrio se consideraron un total de 29 muestras provenientes de tres estados de la República Mexicana: Michoacán (9), Oaxaca (10) y Colima (10). El PCA (Figura 17a) tiene valores de ajuste de $R^2X=0.975$ y de predicción $Q^2=0.925$, con 2PCs; donde el PC1 describe el 78.7% de la variación espectral, mientras que el PC2 describe el 8.59%. El modelo presenta un valor atípico en la gráfica de Hotelling's T^2 , sin embargo, eliminar este dato no mejora la predictibilidad del modelo, por lo que se siguió considerando para análisis subsecuentes. El método supervisado OPLS-DA (Figura 17b) de 2+3+0 variables latentes fue capaz de capturar el 96 % de la variación espectral (R^2X), el 80.8% de la variación del grupo (R^2Y) y la bondad de la predicción (Q^2) fue del 59.2% consiguiendo una clara discriminación entre los jugos de limón agrio de distintas regiones. De este modelo se obtuvieron los bins responsables de la discriminación entre las variedades de especie ($VIP>1.0$, Figura 18) que corresponden a carbohidratos: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol; ácidos orgánicos: ácido málico, ácido aspártico, ácido malónico y ácido cítrico y otros compuestos como metanol, asparagina, GABA, etanol y prolina. Al superponer los espectros de 1H -RMN, se observó una mayor intensidad en la señal de ácido cítrico en el jugo de limón agrio proveniente del estado de Michoacán en comparación con el jugo de limón agrio proveniente de los estados de Oaxaca y Colima. También se observó una menor intensidad de las señales de fructosa, sacarosa y glucosa y ácido málico en los jugos de limón agrio provenientes del estado de Colima en comparación con los otros dos orígenes geográficos.

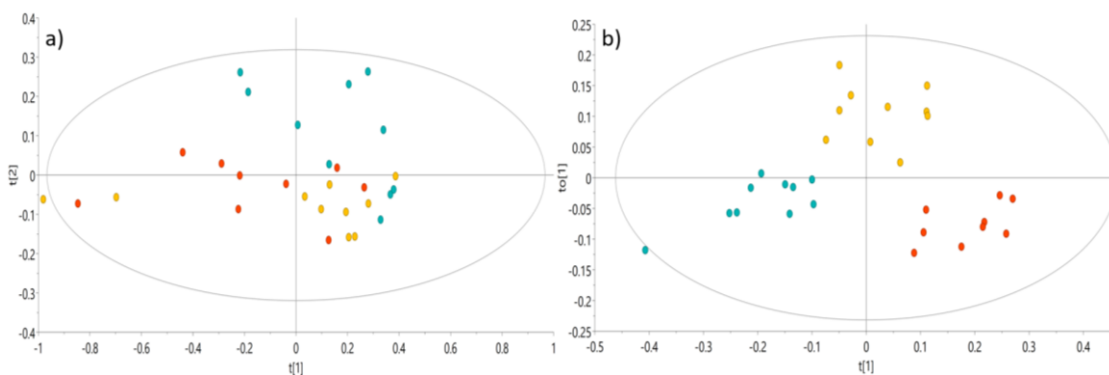


Figura 17. a) Scores del PCA y b) Scores del OPLS-DA de los datos espectrales de ¹H-RMN. Ambos modelos son de 29 muestras de jugo de limón agrio: 10 del estado de Colima (amarillo), 9 del estado de Michoacán (naranja) y 10 del estado de Oaxaca (azul).

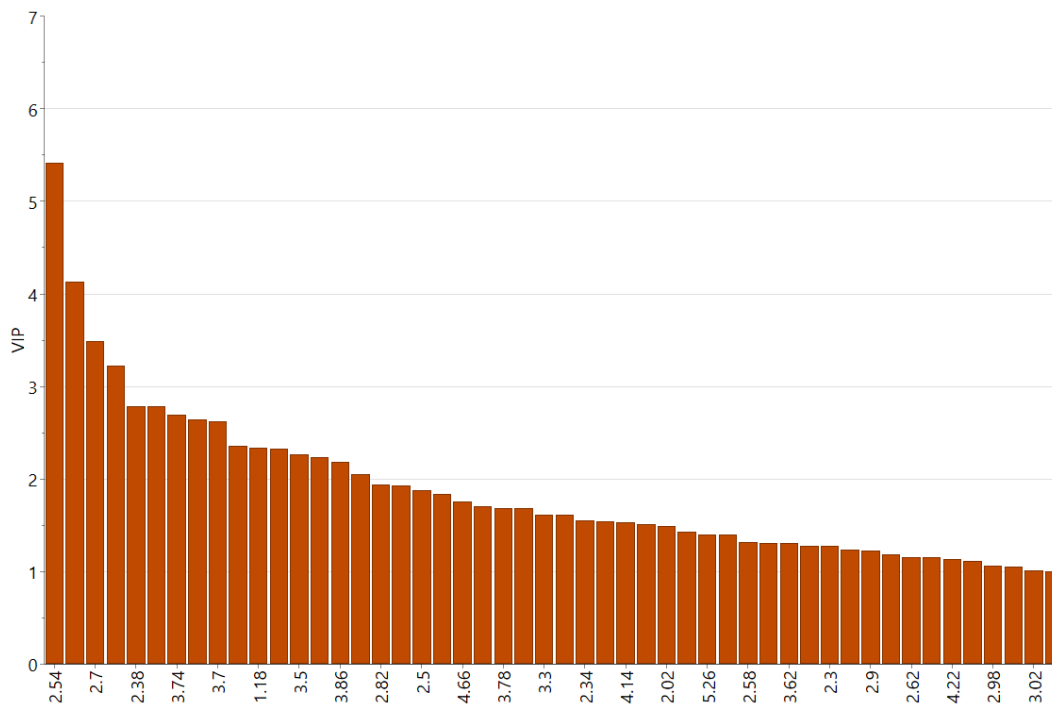


Figura 18: VIP>1.0 del modelo OPLS-DA de 29 muestras de jugo de limón agrio de Colima, Michoacán y Oaxaca.

Tabla 5: Metabolitos identificados en los VIP como señales potenciales para la discriminación de jugo de limón agrio de Colima, Michoacán y Oaxaca.

Metabolito	Bin
Sacarosa	5.42, 4.22, 4.06, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.70, 3.62, 3.58, 3.54, 3.50
Glucosa	5.26, 4.66, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.70, 3.58, 3.54, 3.50, 3.46, 3.42, 3.30, 3.26
Ácido Málico	4.34, 4.30
Fructosa	4.14, 4.06, 4.02, 3.9, 3.86, 3.82, 3.78, 3.74, 3.70, 3.58, 3.62, 3.58
Metanol	3.38
Etanol	3.70, 3.66, 1.22, 1.18
Myo-inositol	3.30
Ácido malónico	3.1
Asparagina	2.90
Ácido aspártico	2.82
Ácido cítrico	2.7, 2.66, 2.62, 2.58, 2.54, 2.50
Ácido málico	2.42, 2.38
Prolina	2.38, 2.06, 2.02
GABA	2.34, 2.30, 1.90

Glutamina	2.1, 2.06
Ácido glutámico	2.06
Alanina	1.50
NI	1.22
NI	1.18
NI	4.30
NI	3.38
NI	3.02
NI	2.98
NI	2.94
NI	2.74
NI	2.42
NI	2.34
NI	2.30
NI	2.18
NI	2.02
NI	1.90

7. CONCLUSIONES

En este estudio se analizaron por $^1\text{H-RMN}$ un total de 129 muestras de jugos de limón de las variedades persa, italiano y agrio provenientes distintos orígenes geográficos (Nuevo León, Tamaulipas, Oaxaca, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Hidalgo, Colima, Argentina y Chile). El análisis se realizó mediante espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ y análisis multivariado.

En los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de las muestras, se identificaron 31 compuestos entre los que se encuentran numerosos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos de alto valor nutricional disponibles para el consumo humano.

Los resultados demostraron que la espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ combinada con análisis estadístico multivariado es una herramienta efectiva para la discriminación de las muestras de jugo de limón en función de su variedad y origen geográfico. Los modelos estadísticos OPLS-DA revelaron la huella química característica de cada jugo estudiado.

Los metabolitos responsables de la diferenciación de los jugos de limón de acuerdo con las variedades estudiadas son: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol, ácido málico, ácido ascórbico, ácido malónico, ácido cítrico, serina, etanol, treonina, prolina, fenilalanina, ácido aconítico, ácido gálico y tirosina. La clasificación en función del origen geográfico fue posible al incluir en los modelos estadísticos exclusivamente muestras de la misma variedad. En el jugo de limón de tipo italiano los metabolitos responsables de la discriminación geográfica entre México, Argentina y Chile son: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, etanol y prolina. En el jugo de limón de tipo persa los metabolitos responsables de la discriminación geográfica entre los estados de Colima, Oaxaca y Veracruz son: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol, ácido málico, ácido ascórbico, ácido cítrico, etanol y prolina. En el jugo de limón de tipo agrio los metabolitos responsables de la discriminación geográfica entre los estados de Colima, Oaxaca y Michoacán son: sacarosa, glucosa, fructosa, myo-inositol, ácido málico, ácido aspártico, ácido malónico, ácido cítrico, metanol, asparagina, GABA, etanol y prolina.

La información presentada en este trabajo sienta las bases para estudiar mediante $^1\text{H-RMN}$ el perfil metabolómico de numerosos cultivos de limón, con el fin de seleccionar los biomarcadores para determinar la variedad y procedencia geográfica.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Vashisth T, Kadyampakeni D. Diagnosis and management of nutrient constraints in citrus. In: *Fruit Crops: Diagnosis and Management of Nutrient Constraints*. Elsevier; 2019. p. 723–37.
2. Saini RK, Ranjit A, Sharma K, Prasad P, Shang X, Gowda KGM, et al. Bioactive Compounds of Citrus Fruits: A Review of Composition and Health Benefits of Carotenoids, Flavonoids, Limonoids, and Terpenes. Vol. 11, *Antioxidants*. MDPI; 2022.
3. Diagnóstico del sector rural y pesquero de México 2012. [cited 2023 Aug 13]; Available from: www.sagarpa.gob.mxwww.fao.org
4. Lado J, Gambetta G, Zacarias L. Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Sci Hort*. 2018 Mar 15;233:238–48.
5. Producción de cítricos en México | Biblioteca de Publicaciones Oficiales del Gobierno de la República | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2024 Feb 13]. Available from: <https://www.gob.mx/publicaciones/articulos/produccion-de-citricos-en-mexico>
6. SENASICA - Análisis Sanitario | Análisis de Impacto Socioeconómico [Internet]. [cited 2023 Aug 13]. Available from: <https://dj.senasica.gob.mx/AnalisisSanitario/Secciones/3>
7. Matheyambath AC, Padmanabhan P, Paliyath G. Citrus Fruits. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Inc.; 2015. p. 136–40.
8. Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Ekiert H. plants Citrus limon (Lemon) Phenomenon-A Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. Available from: www.mdpi.com/journal/plants
9. Denkova-Kostova R, Teneva D, Tomova T, Goranov B, Denkova Z, Shopska V, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (Citrus reticulata L.), grapefruit (Citrus paradisi L.), lemon (Citrus lemon L.) and cinnamon (Cinnamomum zeylanicum Blume). *Z Naturforsch C J Biosci* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Feb 13];76(5–6):175–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33909955/>
10. Citricultura, actividad de alta prioridad para la Secretaría de Agricultura | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx [Internet]. [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/citricultura-actividad-de-alta-prioridad-para-la-secretaria-de-agricultura>

11. Mexico's Citrus Crops Expected to Slide - Citrus Industry Magazine [Internet]. [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://citrusindustry.net/2023/02/09/mexicos-citrus-crops-expected-to-slide/>
12. Vista de Efecto del anillado y bioestimulantes en la floración, producción y calidad de lima Persa (*Citrus Latifolia* Tan.) en invierno | Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas [Internet]. [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/1389/1479>
13. de Jesús Bermúdez Guzmán M, Felipe Guzmán Rodríguez L, de la Paz García Mariscal K, Andrea Palmeros Suárez P, Orozco Santos M. Núm.6 14 de agosto-26 de septiembre. Vol. 8, Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2017.
14. Almadiy AA, Shaban AE, Ibrahim AM, Balhareth SM, El-Gioushy SF, Khater ESG. Partially substituting chemical NPK fertilizers and their impact on Eureka lemon trees (*Citrus limon* L. Burm) productivity and fruit quality. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
15. Idle JR, Gonzalez FJ. *Metabolomics*. Vol. 6, *Cell Metabolism*. 2007. p. 348–51.
16. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. Vol. 137, *Analyst*. Royal Society of Chemistry; 2012. p. 293–300.
17. Hendriks MMWB, Eeuwijk FA van, Jellema RH, Westerhuis JA, Reijmers TH, Hoefsloot HCJ, et al. Data-processing strategies for metabolomics studies. Vol. 30, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2011. p. 1685–98.
18. Oms-Oliu G, Odriozola-Serrano I, Martín-Belloso O. *Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food*. Vol. 54, *Food Research International*. 2013. p. 1172–83.
19. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. Vol. 4, *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Elsevier B.V.; 2013. p. e201301009.
20. Garcia-Perez P, Cassani L, Garcia-Oliveira P, Xiao J, Simal-Gandara J, Prieto MA, et al. Algal nutraceuticals: A perspective on metabolic diversity, current food applications, and prospects in the field of metabolomics. *Food Chem*. 2023 May 30;409.
21. Weljie AM, Newton J, Mercier P, Carlson E, Slupsky CM. Targeted profiling: Quantitative analysis of ^1H NMR metabolomics data. *Anal Chem*. 2006 Jul 1;78(13):4430–42.

22. Bingol K. Recent advances in targeted and untargeted metabolomics by NMR and MS/NMR methods. Vol. 7, High-Throughput. MDPI AG; 2018.
23. Hatzakis E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. Vol. 18, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Blackwell Publishing Inc.; 2019. p. 189–220.
24. Balkir P, Kemahlioglu K, Yucel U. Foodomics: A new approach in food quality and safety. Vol. 108, Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd; 2021. p. 49–57.
25. Agregán R, Echegaray N, Nawaz A, Hano C, Gohari G, Pateiro M, et al. Foodomic-based approach for the control and quality improvement of dairy products. Vol. 11, Metabolites. MDPI; 2021.
26. Ellis DI, Muhamadali H, Chisanga M, Goodacre R. Omics methods for the detection of foodborne pathogens. In: Encyclopedia of Food Chemistry. Elsevier; 2018. p. 364–70.
27. Alahi MEE, Mukhopadhyay SC. Detection methodologies for pathogen and toxins: A review. Vol. 17, Sensors (Switzerland). MDPI AG; 2017.
28. Akhtar MT, Samar M, Shami AA, Mumtaz MW, Mukhtar H, Tahir A, et al. H-NMR-based metabolomics: An integrated approach for the detection of the adulteration in chicken, chevon, beef and donkey meat. *Molecules*. 2021 Aug 1;26(15).
29. Simó C, Ibáñez C, Valdés A, Cifuentes A, García-Cañas V. Metabolomics of Genetically Modified Crops. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014;15:18941–66. Available from: www.mdpi.com/journal/ijms
30. Valdés A, Álvarez-Rivera G, Socas-Rodríguez B, Herrero M, Ibáñez E, Cifuentes A. Foodomics: Analytical Opportunities and Challenges. Vol. 94, Analytical Chemistry. American Chemical Society; 2022. p. 366–81.
31. Cifuentes A. Food analysis and foodomics. Vol. 1216, *Journal of Chromatography A*. Elsevier B.V.; 2009. p. 7109.
32. Aung MM, Chang YS. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. Vol. 39, *Food Control*. Elsevier BV; 2014. p. 172–84.
33. Selamat J, Rozani NAA, Murugesu S. Application of the metabolomics approach in food authentication. Vol. 26, *Molecules*. MDPI; 2021.
34. Li S, Tian Y, Jiang P, Lin Y, Liu X, Yang H. Recent advances in the application of metabolomics for food safety control and food quality analyses. Vol. 61, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 1448–69.

35. Pinu FR, De Carvalho-Silva S, Uetanabaro APT, Villas-Boas SG. Vinegar metabolomics: An explorative study of commercial balsamic vinegars using gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites*. 2016 Sep 1;6(3).
36. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. Vol. 137, *Analyst*. Royal Society of Chemistry; 2012. p. 293–300.
37. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. Vol. 26, *Mass Spectrometry Reviews*. 2007. p. 51–78.
38. Emwas AHM. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2015 [cited 2024 Feb 13];1277:161–93. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-2377-9_13
39. Serag A, Zayed A, Mediani A, Farag MA. Integrated comparative metabolite profiling via NMR and GC–MS analyses for tongkat ali (*Eurycoma longifolia*) fingerprinting and quality control analysis. *Sci Rep*. 2023 Dec 1;13(1).
40. Méndez LP, Martínez P, Ponente C, Cabrera Bean M. PROYECTO FINAL DE CARRERA Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Descripción general y diseño del receptor. 2009;
41. Cheung E, Cash D. Fundamentals of Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) and its applications. In: *Characterization of Biological Membranes: Structure and Dynamics*. De Gruyter; 2019. p. 195–229.
42. Bharti SK, Roy R. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012 May 1;35:5–26.
43. Ben-Tal Y, Boaler PJ, Dale HJA, Dooley RE, Fohn NA, Gao Y, et al. Mechanistic analysis by NMR spectroscopy: A users guide. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2022 Apr 1;129:28–106.
44. Reynolds WF. NMR Pulse Sequences. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. 1999 Jan 1;1554–67.
45. Zheng G, Price WS. Solvent signal suppression in NMR. Vol. 56, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2010. p. 267–88.
46. Le Guennec A, Tayyari F, Edison AS. Alternatives to Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presat and Carr-Purcell-Meiboom-Gill Presat for NMR-Based Metabolomics. Vol. 89, *Analytical Chemistry*. American Chemical Society; 2017. p. 8582–8.

47. Gogiasvili M, Nowacki J, Hergenröder R, Hengstler JG, Lambert J, Edlund K. HR-MAS NMR based quantitative metabolomics in breast cancer. *Metabolites*. 2019 Feb 1;9(2).
48. McKay RT. How the 1D-NOESY suppresses solvent signal in metabolomics NMR spectroscopy: An examination of the pulse sequence components and evolution. *Concepts Magn Reson Part A Bridg Educ Res*. 2011 Sep;38 A(5):197–220.
49. Salvino RA, Colella MF, De Luca G. NMR-based metabolomics analysis of Calabrian citrus fruit juices and its application to industrial process quality control. *Food Control*. 2021 Mar 1;121.
50. Alves Filho EG, Almeida FDL, Cavalcante RS, De Brito ES, Cullen PJ, Frias JM, et al. 1H NMR spectroscopy and chemometrics evaluation of non-thermal processing of orange juice. *Food Chem*. 2016 Aug 1;204:102–7.
51. Spraul M, Schütz B, Humpfer E, Mörtter M, Schäfer H, Koswig S, et al. Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2009 Dec;47(SUPPL. 1).
52. Cuny M, Le Gall G, Colquhoun IJ, Lees M, Rutledge DN. Evolving Window Zone Selection method followed by Independent Component Analysis as useful chemometric tools to discriminate between grapefruit juice, orange juice and blends. *Anal Chim Acta*. 2007 Aug 10;597(2):203–13.
53. Le Gall G, Puaud M, Colquhoun LJ. Discrimination between orange juice and pulp wash by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy: Identification of marker compounds. *J Agric Food Chem*. 2001;49(2):580–8.
54. Heinzmann SS, Brown IJ, Chan Q, Bictash M, Dumas ME, Kochhar S, et al. Metabolic profiling strategy for discovery of nutritional biomarkers: Proline betaine as a marker of citrus consumption. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2010 Aug 1;92(2):436–43.
55. Chin EL, Mishchuk DO, Breksa AP, Slupsky CM. Metabolite signature of *Candidatus liberibacter asiaticus* infection in two citrus varieties. *J Agric Food Chem*. 2014 Jul 16;62(28):6585–91.
56. Slisz AM, Breksa AP, Mishchuk DO, McCollum G, Slupsky CM. Metabolomic analysis of citrus infection by “*Candidatus Liberibacter*” reveals insight into pathogenicity. *J Proteome Res*. 2012 Aug 3;11(8):4223–30.
57. Dhenge R, Langialonga P, Alinovi M, Lolli V, Aldini A, Rinaldi M. Evaluation of quality parameters of orange juice stabilized by two thermal treatments (helical heat

- exchanger and ohmic heating) and non-thermal (high-pressure processing). *Food Control*. 2022 Nov 1;141.
58. Salazar MO, Pisano PL, González Sierra M, Furlan RLE. NMR and multivariate data analysis to assess traceability of argentine citrus. *Microchemical Journal*. 2018 Sep 1;141:264–70.
 59. Zhang X, Breksa AP, Mishchuk DO, Slupsky CM. Elevation, rootstock, and soil depth affect the nutritional quality of mandarin oranges. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 23;59(6):2672–9.
 60. Villa-Ruano N, Pérez-Hernández N, Zepeda-Vallejo LG, Quiroz-Acosta T, Mendieta-Moctezuma A, Montoya-García C, et al. 1H-NMR Based Metabolomics Profiling of Citrus Juices Produced in Veracruz, México. *Chem Biodivers*. 2019 May 1;16(5).
 61. Izquierdo-García JL, Villa P, Kyriazis A, Del Puerto-Nevado L, Pérez-Rial S, Rodriguez I, et al. Descriptive review of current NMR-based metabolomic data analysis packages. Vol. 59, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2011. p. 263–70.
 62. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. Vol. 6, *Journal of Proteome Research*. 2007. p. 469–79.
 63. Pinto RC. Chemometrics methods and strategies in metabolomics. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2017. p. 163–90.
 64. Monakhova YB, Kuballa T, Lachenmeier DW. Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products. Vol. 68, *Journal of Analytical Chemistry*. 2013. p. 755–66.
 65. Zielinski AAF, Haminiuk CWI, Nunes CA, Schnitzler E, van Ruth SM, Granato D. Chemical Composition, Sensory Properties, Provenance, and Bioactivity of Fruit Juices as Assessed by Chemometrics: A Critical Review and Guideline. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014;13(3):300–16.
 66. Mariey L, Signolle JP, Amiel C, Travert J. Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics.
 67. Bosque-Sendra JM, Cuadros-Rodríguez L, Ruiz-Samblás C, de la Mata AP. Combining chromatography and chemometrics for the characterization and authentication of fats and oils from triacylglycerol compositional data-A review. Vol. 724, *Analytica Chimica Acta*. 2012. p. 1–11.
 68. Holmes E, Antti H. Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: Mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. Vol. 127, *Analyst*. Royal Society of Chemistry; 2002. p. 1549–57.

69. Moncayo S, Manzoor S, Navarro-Villoslada F, Caceres JO. Evaluation of supervised chemometric methods for sample classification by Laser Induced Breakdown Spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2015 Aug 5;146:354.
70. Madsen R, Lundstedt T, Trygg J. Chemometrics in metabolomics-A review in human disease diagnosis. *Anal Chim Acta*. 2010 Feb 5;659(1-2):23-33.
71. Van Der Greef J, Smilde AK. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: Past, present, and future. Vol. 19, *Journal of Chemometrics*. 2005. p. 376-86.
72. Triba MN, Le Moyec L, Amathieu R, Goossens C, Bouchemal N, Nahon P, et al. PLS/OPLS models in metabolomics: The impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. Vol. 11, *Molecular BioSystems*. Royal Society of Chemistry; 2015. p. 13-9.