



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación del software ASICS para realizar la identificación y cuantificación automática de metabolitos del vino en espectros RMN-¹H.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QUÍMICO ALAN EMMANUEL AGUILAR VALERIANO

TUTORA: DOCTORA NURIA ESTURAU ESCOFET

INSTITUTO DE QUIMICA

CDMX Septiembre 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EVALUACIÓN DEL SOFTWARE ASICS PARA REALIZAR LA
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN AUTOMÁTICA DE
METABOLITOS DEL VINO EN ESPECTROS RMN-¹H**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Químico Alan Emmanuel Aguilar Valeriano



Ciudad de México, Septiembre 2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto de Química (IQ) por mi formación académica en ciencia.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado (CVU: 1145998).

Al proyecto SAGARPA-CONACYT No. 292836 “Plataforma nacional de metabolómica en espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)-OMICS para la solución de problemas nacionales del sector agroalimentario”

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del IQ.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet por la orientación en mis estudios de posgrado, por el apoyo tanto académico como profesional y por la retroalimentación proporcionada en cada etapa del proyecto.

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

A mis compañeros del LURMN.

Dedicatoria

A mi familia por su inmenso apoyo y cariño en cada etapa de mi vida.

A mis amigos que sin saberlo hacen de mí una mejor persona.

Jurado Asignado

Presidente: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Vocal: Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo

Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla

Vocal: Dr. Fernando Cortés Guzmán

Secretario: Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

El presente trabajo se desarrolló bajo la asesoría de la Dra. Nuria Esturau Escofet en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) del Instituto de Química, UNAM.

Q. Alan Emmanuel Aguilar Valeriano

Dra. Nuria Esturau Escofet

Tabla de contenido

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares	3
3. Antecedentes	4
3.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	4
3.2 RMN- ¹ H cuantitativa	7
3.3 El vino y su estudio mediante RMN	9
3.4 ASICS.....	10
4. Metodología.....	13
4.1 Resonancia Magnética Nuclear.....	13
4.1.1 Equipo.....	13
4.1.2 Adquisición de espectros	13
4.1.3 Procesado de espectros.....	13
4.2 Preparación de muestras.....	13
4.2.1 Disoluciones madre	14
4.2.2 Mezclas de compuestos con señales de RMN- ¹ H sin traslapar.....	15
4.2.3 Mezclas de compuestos con señales de RMN- ¹ H traslapadas.....	17
4.2.4 Vinos	20
4.2.5 Ajuste de pH	20
4.2.6 Problemas en la preparación de muestras	20
4.3 Cuantificación utilizando el software MestreNova	20
4.4 ASICS.....	21
4.4.1 Importación de espectros	21

4.4.2	Creación de la biblioteca de espectros	21
4.4.3	Parámetros de procesamiento	21
4.4.4	Función ASICS, identificación y cuantificación	22
4.4.5	Cuantificación absoluta	23
4.4.6	Evaluación de la identificación de ASICS	24
5.	Análisis de resultados	25
5.1	RMN de mezclas.....	25
5.2	Señales seleccionadas para la biblioteca	26
5.3	Exclusión del acetaldehído en los análisis.....	27
5.4	Evaluación de ASICS en la identificación y cuantificación	28
5.4.1	Mezcla de compuestos con señales de RMN- ¹ H sin traslapar. Comparación con cálculo manual.	28
5.4.2	Mezcla de compuestos con señales de RMN- ¹ H traslapadas	33
5.4.3	Muestras de Vinos.....	34
5.4.4	Errores en el modelado de ASICS.....	37
5.4.5	Sobreestimación y subestimación en la cuantificación de ASICS	46
6.	Discusión.....	48
7.	Conclusiones.....	50
8.	Perspectivas.....	51
Anexo I.	Diseño de mezclas de 12 compuestos.....	52
Anexo II.	Diseño de mezclas de 37 compuestos.....	53
Anexo III.	Cuantificaciones de mezclas con señales de RMN- ¹ H sin traslapar	56
Anexo IV.	Cuantificaciones de mezclas con señales de RMN- ¹ H traslapadas.....	62
Anexo V.	Errores en la identificación de ASICS	75
9.	Bibliografía.....	83

1. Introducción

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 evaluar softwares que identifican y cuantifican de forma automática los metabolitos observados en los espectros de RMN-¹H de muestras de vino.

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica analítica muy utilizada en diversos campos de la ciencia. Para los químicos, su importancia radica en la posibilidad de determinar la estructura molecular de compuestos mediante los espectros que se obtienen de varios núcleos atómicos (¹H, ¹³C, ¹⁵N, ³¹P, entre otros). Entre los primeros estudios que utilizan la RMN como método analítico para el análisis cuantitativo se encuentra el de Jungnickel publicado en 1963. [1] Con el paso de los años, se desarrollaron diversos métodos para la cuantificación por RMN, a la par que se fue consolidando el término qNMR (quantitative NMR).[2,3]

Hoy en día la RMN es ampliamente usada en el campo de la metabolómica, que consiste en el estudio de los metabolitos de células y organismos, siendo estos, compuestos de bajo peso molecular producidos como consecuencia del metabolismo [4]. La RMN posee ciertas ventajas respecto a otros métodos, por ejemplo: es una técnica no destructiva que no requiere de separaciones cromatográficas o derivatizaciones químicas, además de ser excepcionalmente reproducible y automatizable. Sin embargo, también posee algunas desventajas siendo la más importante su baja sensibilidad [5,6].

La identificación y cuantificación de metabolitos en los espectros de RMN de protón (RMN-¹H) en muestras biológicas es un gran reto debido a la dificultad que conlleva el identificar metabolitos a partir de sus señales que muchas veces se solapan parcial o totalmente. Por lo tanto, uno de los principales retos en los estudios de metabolómica mediante RMN es el poder identificar y cuantificar los metabolitos de manera automática y reproducible mediante el uso de softwares. Entre los softwares gratuitos existentes dedicados al análisis de espectros de RMN-¹H con el objetivo de realizar la identificación y cuantificación de compuestos de forma automática, se encuentran: MetaboHunter [7], rDolphin [8], BATMAN [9], Bayesil [10], NMRquant [11] y ASICS [12].

En la presente investigación se evaluó la paquetería de R ASICS [12–14] (*Automatic Statistical Identification in Complex Spectra*) para realizar la identificación y cuantificación automática de un conjunto de 38 metabolitos presentes en muestras de vino. ASICS fue seleccionado ya que es una paquetería que recibe mantenimiento periódicamente (última versión publicada el 25/04/2023), mejorando su funcionamiento o implementando nuevas características. Para la evaluación de ASICS, primero se creó una biblioteca de espectros de RMN-¹H y posteriormente se probó la identificación y cuantificación automática del software en espectros de: mezclas con señales de resonancia sin traslapar, mezclas con señales de resonancia traslapadas, y en dos muestras de vino. Además, para el caso de las mezclas con señales de resonancia sin traslapar, los resultados de ASICS se compararon con los resultados de cuantificación utilizando el método de integrales haciendo uso del software MestreNova (v.14.2.0, Mestrelab Research, S.L.), el cual es un software diseñado para el análisis de datos de espectros de RMN que puede ser usado en Windows, Mac OS y Linux.

La presente tesis está estructurada en 7 capítulos. El capítulo 1 consiste en una breve *introducción* acerca del uso de softwares para la cuantificación de metabolitos mediante espectros RMN-¹H. En el capítulo 2 se presentan los *objetivos* del trabajo. En el capítulo 3, *Antecedentes*, se da una introducción acerca de los temas centrales de la tesis, empezando por los fundamentos teóricos de RMN y las características principales de un espectro RMN-¹H; se aborda el tema de RMN-¹H cuantitativa, enfocándolo al método de cuantificación de estándar interno y mediante el uso de una biblioteca de espectros; también se da una introducción acerca del vino y su estudio mediante RMN; y finalmente se describen los fundamentos teóricos del algoritmo de identificación y cuantificación del software ASICS. En el capítulo 4, *Metodología*, se describen las condiciones experimentales empleadas, el método de preparación de muestras, los parámetros seleccionados para el cálculo de integrales con el software MestreNova y para la identificación y cuantificación automática con el software ASICS. En el capítulo 5, *Análisis de resultados*, se presentan y analizan los resultados de las cuantificaciones para las disoluciones estudiadas y las muestras de vino. En el capítulo 6, *Discusión*, se desarrolla una discusión sobre los resultados obtenidos de identificación y cuantificación con ASICS y con el cálculo de integrales. Finalmente, en el capítulo 7 se presentan las principales conclusiones obtenidas de este trabajo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la paquetería de R ASICS para realizar la identificación y cuantificación automática de algunos de los metabolitos observados en los espectros de RMN-¹H de muestras de vino.

2.2 Objetivos particulares

- Adquirir los espectros de RMN-¹H de 38 compuestos puros en disolución hidroalcohólica para construir la biblioteca de ASICS.
- Evaluar la identificación y cuantificación realizada por ASICS en:
 - Espectros de mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar.
 - Espectros de mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H traslapadas.
 - Espectro de RMN-¹H de muestras de vino.

3. Antecedentes

3.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

En esta sección se explica someramente el fundamento de la RMN. Una explicación detallada puede encontrarse en distintos libros. [15–19]

La espectroscopia de RMN se fundamenta en una propiedad intrínseca de los núcleos atómicos llamada espín. El espín nuclear I tiene asociado un momento angular intrínseco P , mismo que a su vez tiene asociado un momento magnético μ que es el responsable de la interacción de los núcleos atómicos con un campo magnético externo B_0 . A continuación, se explicará la relación matemática entre cada una de estas propiedades.

Los núcleos atómicos con espín nuclear I distinto de cero tienen un momento angular P distinto de cero que está cuantizado:

$$P = \sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (3.1)$$

En la ecuación (3.1) el espín nuclear I puede tomar los siguientes valores: $0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, 2, \dots, 6$. Por otra parte, el momento angular P se relaciona con el momento magnético μ mediante la siguiente ecuación vectorial:

$$\mu = \gamma P \quad (3.2)$$

en la cual γ es la constante giromagnética. La constante γ es de gran relevancia en RMN debido a que la sensibilidad en la detección de un núcleo depende en gran medida de su magnitud. Por lo tanto, la magnitud del vector momento magnético μ se puede expresar de la siguiente manera:

$$\mu = \gamma\sqrt{I(I + 1)}\hbar \quad (3.3)$$

Cualquier núcleo con espín I tiene $(2I + 1)$ estados degenerados en ausencia de un campo externo, por el contrario, cuando se aplica un campo, la degeneración se rompe y los $(2I + 1)$ estados (en principio degenerados) pasan a tomar distintos valores energéticos de acuerdo con el número cuántico m que puede tomar los siguientes valores:

$$m = I, I - 1, \dots, -I \quad (3.4)$$

Si consideramos que un campo magnético B_0 es aplicado a lo largo del eje z , entonces el valor del vector momento angular P en la dirección del eje z es:

$$P_z = m\hbar \quad (3.5)$$

por lo tanto, el valor de la componente z del momento magnético es:

$$\mu_z = m\gamma\hbar \quad (3.6)$$

La energía de un dipolo magnético bajo un campo magnético \mathbf{B}_0 esta descrita por la siguiente ecuación:

$$E_{mag} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \quad (3.7)$$

Considerando la ecuación (3.6), la ecuación (3.7) se convierte en:

$$E_{mag} = -m\gamma\hbar B_0 \quad (3.8)$$

Si consideramos núcleos con un espín nuclear $I = \frac{1}{2}$ (tal es el caso del ^1H y ^{13}C) expuestos a un campo magnético \mathbf{B}_0 , estos presentaran dos estados energéticos definidos por la ecuación (3.8) y por los dos valores de $m = \frac{1}{2}, -\frac{1}{2}$. El estado de mayor energía lo presentaran aquellos núcleos con el momento magnético orientado en dirección contraria al campo aplicado y viceversa (ecuación (3.7)).

La diferencia energética entre los niveles energéticos para una especie con espín $I = \frac{1}{2}$ aumenta al incrementar el campo magnético y también al incrementar la constante giromagnética como se puede observar en la ecuación (3.9).

$$\Delta E_{mag} = -\left(-\frac{1}{2}\right)\gamma\hbar B_0 + \left(\frac{1}{2}\right)\gamma\hbar B_0 = \gamma\hbar B_0 \quad (3.9)$$

Al aplicar un campo magnético el momento magnético del espín nuclear comienza a girar alrededor del campo. La frecuencia de giro es constante, así como el ángulo entre el campo y el momento magnético. Este movimiento en forma de cono es conocido como precesión, y la frecuencia a la cual se efectúa el giro es conocida como frecuencia angular de Larmor (ecuación (3.10)).

$$\nu_{Larmor} = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{\gamma H}{2\pi} \quad (3.10)$$

Ahora bien, para que un núcleo entre en resonancia, es necesario aplicar radiación electromagnética con la misma frecuencia que la de Larmor.

$$\Delta E_{mag} = \gamma\hbar H = h\nu_{Larmor} = E_{fotón} = h\nu_{fotón} \quad (3.11)$$

Sin embargo, la mecánica cuántica indica que solo puede existir una absorción neta de energía cuando hay un mayor número de partículas en el nivel de baja energía. Si las dos poblaciones (alta y baja energía) son iguales, el número de transiciones del nivel de baja energía al de alta energía serán igual al de las transiciones de alta energía al de baja energía y por lo tanto no podrá existir una absorción neta (saturación).

Utilizando la distribución de Boltzmann (ecuación (3.12)) se logra demostrar que la probabilidad de encontrar núcleos en el estado de baja energía es ligeramente mayor que la probabilidad de encontrarlos en el estado de alta energía.

$$\frac{P_{m=-1/2}}{P_{m=+1/2}} = e^{-\beta\gamma\hbar B_0} \quad (3.12)$$

El resultado de aplicar radiación electromagnética a la frecuencia de Larmor nos permite observar transiciones energéticas cuando los núcleos regresan a su estado de equilibrio. Los datos que se obtienen surgen de los cambios de inducción magnética sobre la bobina en función del tiempo, mismos que mediante la transformada de Fourier son convertidos a datos en función de las frecuencias (espectro de RMN).

El espectro de RMN se caracteriza por presentar un determinado número de señales que se describen principalmente por:

- Desplazamiento químico (δ): Frecuencia de resonancia de un tipo de núcleo atómico con relación a una frecuencia de referencia. El desplazamiento químico está determinado por el entorno electrónico y magnético del tipo de núcleo observado, núcleos muy protegidos presentan menores frecuencias de resonancia con respecto a núcleos desprotegidos.
- Multiplicidad: La multiplicidad es el resultado del acoplamiento espín-espín y se produce por la interacción de núcleos vecinos no equivalentes. Esta interacción genera un desdoblamiento de las señales, donde la distancia entre picos de los multipletes medida en Hz se conoce como constante de acoplamiento (J).
- Área bajo la curva: El área bajo la curva de una señal de resonancia es proporcional al número de núcleos que la generan. Este es el fundamento de todas las técnicas de cuantificación por RMN.

La RMN no es un método analítico selectivo o específico, ya que al ser un método de detección universal detecta todos aquellos analitos que se encuentran por arriba de una

determinada concentración (usualmente en el orden μM), lo cual genera el traslape de señales dificultando la identificación de los compuestos.[20]

3.2 RMN- ^1H cuantitativa

La RMN es una técnica cuantitativa debido a que la integral de una señal es proporcional al número de núcleos que la generan; por lo tanto, la RMN determina directamente la concentración de un compuesto siempre y cuando el experimento se realice con los parámetros adecuados [21].

La importancia de definir las condiciones y parámetros en los experimentos de RMN cuantitativa radica en que el desplazamiento químico, la intensidad y el ancho de las señales dependen de las propiedades de la muestra, tales como: pH, tipo de sales usadas, oxígeno disuelto, presencia de iones paramagnéticos, disolvente, temperatura, homogeneidad del campo magnético, etc. Mientras que la calidad de los espectros y la presencia de distorsiones o anomalías en los picos dependen de: secuencia de pulsos, técnica de supresión del disolvente, número de puntos adquiridos, tiempo de adquisición, ganancia del receptor, calidad de la sintonización, ajuste del campo magnético, entre otros. [2,22]

Con respecto a la metabolómica cuantitativa mediante RMN, existen diversos métodos para el cálculo de concentraciones absolutas, por ejemplo: Estándar interno, estándar externo, curvas de calibración, ERETIC (Electronic Reference To Access In-vivo Concentration) [23], QUANTAS (Quantification by Artificial Signal) [24], PIG (Pulse Into the Gradient) [25], PULCON (Pulse Length Based Concentration determination) [26], entre otros.

En el método de estándar interno se adiciona a la muestra un compuesto de concentración conocida que cumple con algunas características, tales como: elevada pureza, estable, químicamente inerte, no volátil, no higroscópico, soluble, pero sobre todo, su señal de resonancia debe encontrarse suficientemente separada de las demás señales del espectro y se recomienda sea un singulete. Algunos de los compuestos más utilizados son el DSS (trimetilsililpropanosulfonato de sodio) y el TSP (ácido trimetilsililpropanoico).

La concentración relativa de un metabolito se calcula relacionando la integral de su señal con la integral del estándar interno tal como se muestra en la ecuación (3.13), como se

observa, la integral de cada señal debe ser dividida entre su correspondiente número de protones para poder ser comparadas

$$\frac{[M]}{[std]} = \frac{I_M}{I_{std}} \times \frac{N_{std}}{N_M} \quad (3.13)$$

donde $[M]$ y $[std]$ es la concentración del metabolito y del estándar interno (conocida con exactitud) respectivamente, I_M y I_{std} son las integrales de sus señales, N_M y N_{std} son el número de protones que contribuyen a esas señales.

Para el cálculo de concentración absoluta se despeja $[M]$ de la ecuación (3.13); no obstante, para poder realizar la cuantificación es necesario cumplir con la siguiente relación:

$$t > 5 \times T_1 \quad (3.14)$$

donde T_1 es el tiempo de relajación longitudinal (el recíproco T_1^{-1} es la constante de rapidez del proceso de relajación) y t es el tiempo de repetición (tiempo necesario para adquirir un escaneo, incluye el tiempo de adquisición y el retardo de reciclaje). Dado que no se cumple con la relación (3.14) para el TSP y los metabolitos estudiados, sus señales de resonancia se ven atenuadas afectando el valor de su integral, por lo tanto, se debe de aplicar un factor de corrección (ecuación (3.15)) que considera los tiempos de relajación T_1 de M , del estándar interno y el tiempo de repetición t . [3]

$$[M_{real}] = [M_{calc}] \left[\frac{(1 - e^{-t/T_1^S})}{(1 - e^{-t/T_1^M})} \right] \quad (3.15)$$

donde $[M_{real}]$ es la cuantificación corregida, $[M_{calc}]$ es la cuantificación calculada con la ecuación (3.13) usando el tiempo de repetición t , T_1^S y T_1^M son los tiempos de relajación T_1 del estándar interno y del metabolito M , respectivamente.

También es posible realizar cuantificaciones absolutas haciendo uso de una biblioteca de espectros de RMN-¹H de compuestos puros de concentración conocida [27,28]. Para tal fin se comparan las integrales de los espectros de la biblioteca con las integrales en los espectros de las mezclas (ecuación (3.16)).

$$[M_{mezcla}] = \frac{I_{M,mezcla} * [M_{biblioteca}]}{I_{M,biblioteca}} \quad (3.16)$$

donde $[M_{mezcla}]$, $[M_{biblioteca}]$ son la concentración del metabolito M en la mezcla y en la biblioteca, respectivamente, $I_{M,mezcla}$, $I_{M,biblioteca}$ son las integrales de sus señales. Cabe destacar que los espectros de la biblioteca deben ser adquiridos bajo las mismas condiciones que los espectros de las mezclas, y gracias a que el tiempo de adquisición de la FID es el mismo en todos los espectros, no es necesario conocer los tiempos de relajación T_1 de los compuestos a cuantificar y tampoco se requiere corregir las cuantificaciones con la ecuación (3.15).

Hay que tener en cuenta que algunos compuestos serán más factibles de cuantificar respecto a otros, por ejemplo: los compuestos con señales de baja multiplicidad son preferidos respecto a los que tienen multipletes complejos; la integral de las señales se ve limitada a aquellas que no se encuentran traslapadas a menos que se utilice un método como la desconvolución para su cálculo; y por último, las señales no deberán estar ubicadas cerca de las señales suprimidas del disolvente ya que se suele distorsionar el valor de la integral. [29]

3.3 El vino y su estudio mediante RMN

Los vinos tienen una composición química muy compleja que incluye cientos de metabolitos, entre los que destacan aminoácidos, alcoholes, azúcares, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos y compuestos carbonílicos en un amplio rango de concentraciones. En Europa el vino es un producto de gran importancia económica y su consumo en distintas regiones del mundo como Argentina, Chile y Estados Unidos también es relevante. La importancia en el mercado de este producto generó la aparición de malas prácticas y productos adulterados que impulsaron el interés en desarrollar métodos analíticos robustos y confiables para el control de dicha problemática [29]. Algunos de estos métodos consisten en la aplicación de métodos quimiométricos (PCA, PLS, etc.) junto con RMN- ^1H cuantitativa para identificar diversas características de gran importancia en vinos, por ejemplo: origen geográfico, variedad de uva, año de cosecha, tipo de levadura empleada en la fermentación, entre otros. [28]

Algunos de los métodos reportados de RMN- ^1H cuantitativa para el análisis de vinos y en específico para la determinación cuantitativa de sus metabolitos son: estándar interno [30], estándar externo con PULCON [31,32], así como el uso de una biblioteca de espectros de referencia [28].

Debido a que la composición química de los vinos es compleja, el número de señales observadas en los espectros de RMN-¹H es abrumadora; el análisis de identificación es un proceso complicado y lento, además de que solo es posible identificar un número limitado de metabolitos debido a que el traslape de las señales imposibilita la detección de los metabolitos en baja concentración. Respecto a la cuantificación, es necesario el uso de métodos de desconvolución para calcular el área de las señales.

Por lo tanto, es necesario el uso de softwares que faciliten el proceso de identificación y cuantificación en muestras complejas. El software comercial más utilizado para este fin es Chenomx (Chenomx Inc., Edmonton, Canada), no obstante, la licencia es costosa y el método de identificación y cuantificación es lento puesto que requiere del criterio del usuario para la identificación de las señales. [12] Debido a esto, los softwares libres que prometen realizar la identificación y cuantificación automática son atractivos ya que de funcionar correctamente reducirían los tiempos de análisis. Tal es la necesidad de tener que evaluar el desempeño de estos softwares en muestras de vinos reales.

3.4 ASICS

ASICS (Automatic Statistical Identification in Complex Spectra) es una paquetería de R y a su vez es el nombre de un método basado en teoría estadística con la promesa de poder identificar y cuantificar metabolitos en mezclas complejas mediante espectros de RMN-¹H reduciendo el tiempo de análisis. [12–14]

El funcionamiento de ASICS se basa a grandes rasgos en cuatro pasos que se describen a continuación (la descripción completa puede consultarse en el artículo donde se presentó ASICS [12]):

1. Creación de la biblioteca de referencia

El modelo de ASICS se basa en el uso de una biblioteca de espectros de protón de compuestos puros que son adquiridos de manera independiente bajo condiciones similares (pH, temperatura, etc.) respecto a las muestras de interés. Cabe destacar que para poder calcular cuantificaciones absolutas la concentración de todos los compuestos de la biblioteca deberá ser la misma.

2. Limpieza de la biblioteca

Todos los compuestos de la biblioteca que no presentan sus señales de RMN-¹H en la mezcla son eliminados de la biblioteca. Al finalizar este paso la biblioteca termina con un número p de compuestos, donde $p \leq \text{número inicial de compuestos}$.

3. Alineación de la biblioteca de referencia

- Este paso se subdivide en dos etapas, la primera consiste en una alineación global de los espectros de la biblioteca con el espectro de la mezcla.
- La segunda etapa consiste en una alineación local, en la cual cada señal de los espectros de la biblioteca es alineada de manera independiente con las señales del espectro de la mezcla.

4. Cuantificación de los compuestos

Utilizando la biblioteca alineada, se procede a realizar la cuantificación que se basa en el siguiente modelo (ecuación (3.17)), que consiste en una combinación lineal de los espectros alineados de la biblioteca:

$$g(t) = \sum_{i=1}^p \beta_i f_i(\Phi_i(t)) + \epsilon(t) \quad | \quad \beta_i \geq 0 \quad (3.17)$$

donde g es el espectro modelado de la muestra compleja, f_i son los p espectros de la biblioteca, ϕ_i son funciones de deformación (*warping functions*) que ajustan el desplazamiento químico de las señales de la biblioteca, ϵ es un término de ruido, β_i son coeficientes estimados para cada metabolito y t es el desplazamiento químico en ppm. Cabe destacar que las cuantificaciones relativas reportadas por ASICS corresponden a:

$$Q_i = \frac{\beta_i}{N_i} \quad (3.18)$$

donde N_i corresponde al número de protones asociados a la señal del metabolito i .

Las cuantificaciones proporcionadas por ASICS son relativas respecto a los espectros de la biblioteca, por ejemplo, cuando $\beta_i = 1$ la intensidad de la señal del metabolito i en la mezcla es igual a la intensidad del metabolito en el espectro de la biblioteca (ver ecuación (3.17)), y por lo tanto, la cuantificación que obtenemos del compuesto i es $Q_i = \frac{\beta_i}{N_i} = \frac{1}{N_i}$. Valores de $\beta_i > 1$ indican que la intensidad de la señal del metabolito i en la mezcla es mayor que la del espectro de la biblioteca, mientras que valores de $\beta_i < 1$ indican lo contrario.

Para el cálculo de concentraciones absolutas se hace uso de la ecuación (3.19), que requiere de la adición de un estándar interno,

$$Q_{i,abs} = \frac{Q_{i,rel} C_{STD}}{Q_{STD,rel}} \quad (3.19)$$

donde $Q_{i,rel}$ y $Q_{STD,rel}$ son las cuantificaciones relativas proporcionadas por ASICS del compuesto i y del estándar interno respectivamente, C_{STD} es la concentración del estándar interno (conocida con exactitud) y $Q_{i,abs}$ es la concentración absoluta del compuesto i .

4. Metodología

4.1 Resonancia Magnética Nuclear

4.1.1 Equipo

Los experimentos de RMN se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance III de 16.44 Tesla (700 MHz para ^1H), equipado con una sonda criogénica de triple resonancia con bobina de gradientes en el eje z para tubos de 5 mm.

4.1.2 Adquisición de espectros

Los espectros fueron adquiridos a 300 K utilizando una secuencia de pulsos con supresión de agua y etanol (*noesygppszgpr1d*), sin giro del tubo de RMN. Los espectros de RMN- ^1H se adquirieron con los siguientes parámetros: D1: 4 s, AQ: 2.32 s, NS: 32, DS: 4, SW: 14097 Hz, RG: 16.0.

4.1.3 Procesado de espectros

Los espectros de RMN- ^1H fueron procesados utilizando el software TopSpin 3.5 de Bruker. Se ajustó la fase manualmente, la línea base se ajustó de forma automática utilizando un algoritmo polinomial de quinto grado y se apodizaron a 0.3 Hz utilizando el método de multiplicación exponencial.

Posterior al procesado con TopSpin los archivos *1r* fueron importados a MestreNova v.14.2.0 donde se corrigió manualmente la línea base de los espectros utilizando el algoritmo “*segmento suavizado*”. Posterior al ajuste de línea base, los espectros fueron normalizados al área de TSP (*valor* = 100, *rango* = [0.06, -0.06]).

4.2 Preparación de muestras

Las alícuotas de las disoluciones preparadas en la presente investigación fueron tomadas con un set de pipetas electrónicas marca Sartorius Picus[®]NxT de un canal con las siguientes capacidades: 0.2-10 μL , 10-300 μL , 50-1000 μL , 100-5000 μL .

4.2.1 Disoluciones madre

Todos los reactivos utilizados en la presente investigación fueron de la marca SigmaAldrich®, los datos de pureza, masa molar y concentración de las disoluciones madre se muestran en la Tabla 1.

Para los compuestos volátiles (2-metilpropanol, 3-metilbutanol, acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, cadaverina, furfural, metanol y lactato de etilo) se utilizó una microbalanza Mettler Toledo® XP6. Se prepararon 1.5 mL de cada disolución madre utilizando frascos Agilent® de 1.5 mL con tapa a rosca y septum. Para tomar el volumen necesario de cada reactivo se utilizó una jeringa Hamilton de 50 µL o una jeringa Agilent® de 10 µL dependiendo el caso. Las alícuotas fueron inyectadas y pesadas en los frascos de 1.5 mL que contenían previamente la cantidad de disolvente (EtOH/H₂O al 12%) adecuada.

Para preparar las disoluciones madre de los compuestos restantes de la biblioteca se utilizó una balanza Sartorius® modelo SECURA125-1S. Se prepararon 5 mL de disolución de cada reactivo utilizando como disolvente EtOH/H₂O al 12% y material volumétrico. Las disoluciones fueron almacenadas en frascos marca Supelco® de 7 mL.

Tabla 1. Compuestos utilizados para la creación de la biblioteca de ASICS, se presentan los datos de pureza y masa molar de cada compuesto así como la concentración de las disoluciones madre. También se muestra la concentración representativa reportada para los compuestos en vinos.

N°	Compuesto	Pureza (%)	Masa molar [g/mol]	Conc. disolución madre [mM]	Conc. representativa en vinos [mM][28]
1	1,3-propanodiol	98	76.09	449.75	2.7
2	2-metilpropanol	99.5	74.12	251.64	1.3
3	3-metilbutanol	98.5	88.15	220.48	4.5
4	Acetaldehído	99	44.05	-	0.8
5	Acetato de etilo	99.8	88.11	379.87	2.3
6	Acetoína	100	88.11	182.32	0.5
7	Ácido acético	99.7	60.05	1770.01	8.2
8	Ácido benzoico	99.5	122.12	20.35	0.7
9	Ácido caftárico	97	312.23	4.17	0.1 ^a
10	Ácido cítrico	99	192.12	584.95	2.6
11	Ácido fórmico	95	46.03	374.21	2.1 ^a
12	Ácido fumárico	99	116.07	12.62	0.1
13	Ácido galacturónico	97	212.15	773.49	4.6
14	Ácido gálico	98	188.13	36.89	0.3
15	Ácido glucónico	99	218.14	435.86	2.5

N°	Compuesto	Pureza (%)	Masa molar [g/mol]	Conc. disolución madre [mM]	Conc. representativa en vinos [mM][28]
16	Ácido láctico	90	90.08	1888.96	11.3
17	Ácido málico	99	134.09	1137.09	6.6
18	Ácido pirúvico	98	88.06	266.87	0.6
19	Ácido salicílico	99	138.12	19.38	0.7
20	Ácido shikímico	99	174.15	20.18	0.3
21	Ácido sórbico	99	112.13	10.97	0.8
22	Ácido tartárico	99	150.09	803.29	33.1
23	Alanina	98	89.09	190.48	1.1
24	Arabinosa	99	150.13	547.50	3.3
25	Arginina	98.5	174.20	487.24	2.9
26	Cadaverina	96.5	102.18	35.28	0.1 ^a
27	Epicatequina	90	290.27	6.70	0.2
28	Fructosa	99	180.16	953.95	5.6
29	Furfural	99	96.08	54.03	0.2
30	GABA	99	103.12	334.63	2.0
31	Glucosa	99	180.16	912.09	5.5
32	HMF	99	126.11	24.24	0.1
33	Lactato de etilo	98	118.13	436.79	2.6
34	Metanol	99.9	32.04	520.85	6.3
35	Prolina	99	115.13	1453.88	8.7
36	Putrescina	99	88.15	52.38	0.1 ^a
37	Sacarosa	95	342.30	250.60	1.5
38	Trigonelina	100	173.60	50.46	0.3
39	TSP	98	172.27	-	-

a: ref [33]

4.2.2 Mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar

Se prepararon 15 mezclas de 12 compuestos cuyas señales de RMN-¹H no se traslapan. Para la preparación de estas las mezclas se consideraron cinco niveles de concentración para cada compuesto, la asignación de los niveles en cada mezcla fue realizada de manera aleatoria con la única restricción de que cada nivel se repitiera al menos tres veces por compuesto. En la Tabla 2 se muestra el diseño experimental con los niveles de concentración utilizados para cada compuesto y en la Tabla 3 se presenta la concentración asociada a cada nivel.

Tabla 2. Diseño utilizado para la preparación de las mezclas con 12 compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar. Los números hacen referencia a los niveles de concentración; 1: Muy bajo, 2: Bajo, 3: Medio, 4: Alto, 5: Muy alto.

Compuesto	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
1,3-propanodiol	5	3	4	3	1	4	2	3	2	5	1	2	4	5	1
Acetaldehído	1	5	5	4	4	2	2	1	3	5	1	3	4	3	2
Ácido acético	3	3	3	5	4	2	5	5	1	4	1	4	2	2	1
Ácido cítrico	1	2	3	4	4	2	4	5	3	5	2	3	1	1	5
Ácido fórmico	1	5	3	1	2	5	4	5	2	3	4	2	3	4	1
Ácido fumárico	5	3	4	4	3	1	4	3	2	5	1	2	1	5	2
Ácido gálico	1	2	1	4	5	5	2	1	3	4	4	2	5	3	3
Ácido pirúvico	5	2	3	1	4	4	2	3	4	5	3	1	1	5	2
Ácido salicílico	5	4	2	5	3	2	1	1	5	3	2	3	1	4	4
Ácido tartárico	4	1	3	2	5	2	1	3	4	2	5	4	1	3	5
Alanina	5	1	4	2	3	3	2	4	1	5	3	5	4	2	1
Metanol	5	2	3	1	4	5	3	2	1	2	4	5	4	3	1

Para definir los niveles de concentración se utilizaron como referencia concentraciones reportadas en la literatura que se presentan en la Tabla 1. Estas fueron utilizadas como el nivel medio de concentración. Los demás niveles fueron calculados de la siguiente manera:

$$C_{Muybaja} = \frac{1}{3} C_{media},$$

$$C_{baja} = \frac{1}{2} C_{media},$$

$$C_{Alta} = 2 C_{media},$$

$$C_{Muyalta} = 3 C_{media}.$$

Tabla 3. Niveles de concentración para cada uno de los compuestos.

Compuesto	1: Muy bajo [mM]	2: Bajo [mM]	3: Medio [mM]	4: Alto [mM]	5: Muy alto [mM]
1,3-propanodiol	0.90	1.35	2.70	5.40	8.10
Acetaldehído	0.27	0.40	0.80	1.60	2.40
Ácido acético	2.73	4.10	8.20	16.40	24.60
Ácido cítrico	0.87	1.30	2.60	5.20	7.80
Ácido fórmico	0.70	1.05	2.10	4.20	6.30
Ácido fumárico	0.03	0.05	0.10	0.20	0.30
Ácido gálico	0.10	0.15	0.30	0.60	0.90

Compuesto	1: Muy bajo [mM]	2: Bajo [mM]	3: Medio [mM]	4: Alto [mM]	5: Muy alto [mM]
Ácido pirúvico	0.20	0.30	0.60	1.20	1.80
Ácido salicílico	0.23	0.35	0.70	1.40	2.10
Ácido tartárico	11.03	16.55	33.10	66.20	99.30
Alanina	0.37	0.55	1.10	2.20	3.30
Metanol	2.10	3.15	6.30	12.60	18.90

En la Tabla 12 (Anexo I) se muestran con detalle las alícuotas de disolución madre adicionadas de cada compuesto para preparar un mililitro de cada mezcla.

4.2.3 Mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H traslapadas

Se prepararon 9 mezclas de 38 compuestos cuyas señales de RMN-¹H se traslapan. Para la preparación de las mezclas se consideraron tres niveles de concentración para cada compuesto, la asignación de los niveles en cada mezcla fue realizada de manera aleatoria con la única restricción de que cada nivel se repitiera al menos tres veces por metabolito. En la Tabla 4 se muestra el diseño experimental con los niveles utilizados para cada compuesto y en la Tabla 5 se presenta la concentración asociada a cada nivel.

Tabla 4. Diseño utilizado para la preparación de las mezclas de 37 compuestos. Los números hacen referencia a los niveles de concentración; 1: Bajo, 2: Medio, 3: Alto.

Compuesto	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
1,3-Propanodiol	1	2	2	3	3	1	3	2	1
2-Metilpropanol	3	2	2	3	1	1	1	2	3
3-Metilbutanol	1	2	3	1	3	3	1	2	2
Acetato de etilo	1	2	3	3	1	3	1	2	2
Acetoína	2	3	2	3	3	1	2	1	1
Ácido Acético	2	2	2	3	1	3	3	1	1
Ácido benzoico	1	2	3	1	3	2	2	1	3
Ácido caftárico	1	2	1	2	3	2	3	3	1
Ácido cítrico	2	3	2	1	3	1	2	1	3
Ácido fórmico	1	2	3	2	2	1	3	3	1
Acido fumárico	2	2	1	3	2	1	3	3	1
Ácido galacturónico	1	1	3	2	2	1	3	3	2
Ácido gálico	2	3	1	3	2	1	2	3	1
Ácido glucónico	2	1	2	1	3	3	1	2	3
Ácido láctico	3	1	1	2	1	2	3	2	3
Ácido málico	3	1	2	2	1	3	3	2	1

Compuesto	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Ácido pirúvico	2	2	3	3	1	1	1	2	3
Ácido salicílico	3	2	1	1	1	3	2	3	2
Ácido shikímico	2	3	1	2	1	3	3	1	2
Ácido sórbico	1	3	2	3	3	1	2	1	2
Ácido tartárico	3	3	2	1	1	3	2	1	2
Alanina	2	1	3	2	1	1	2	3	3
Arabinosa	3	2	1	3	1	1	2	2	3
Arginina	3	3	2	3	1	1	2	1	2
Cadaverina	1	1	2	2	1	2	3	3	3
Epicatequina	3	2	3	1	1	2	2	1	3
Fructosa	1	3	2	3	2	3	1	1	2
Furfural	1	3	2	2	1	3	1	3	2
GABA	1	2	2	1	3	1	3	2	3
Glucosa	3	2	1	3	1	1	2	3	2
HMF	3	1	1	3	3	2	2	2	1
Lactato de etilo	3	1	2	2	3	1	1	3	2
Metanol	3	1	1	2	1	3	2	3	2
Prolina	2	1	3	1	1	2	3	3	2
Putrescina	2	3	2	3	1	1	3	1	2
Sacarosa	2	1	3	3	1	3	2	2	1
Trigonelina	2	1	1	3	1	3	2	2	3

Al igual que con las mezclas de 12 compuestos se utilizaron como referencia las concentraciones reportadas en la literatura presentadas en la Tabla 1. Estas concentraciones fueron utilizadas como el nivel medio, mientras que los niveles alto y bajo fueron calculados de la siguiente manera:

$$C_{bajo} = \frac{1}{2} C_{medio}$$

$$C_{alto} = 2 C_{medio}$$

Tabla 5. Niveles de concentración para cada uno de los 37 compuestos considerados.

Compuesto	1 : Bajo [mM]	2 : Medio [mM]	3 : Alto [mM]
1,3-Propanodiol	1.35	2.7	5.4
2-Metilpropanol	0.65	1.3	2.6
3-Metilbutanol	2.25	4.5	9
Acetato de etilo	1.15	2.3	4.6
Acetoína	0.25	0.5	1

Compuesto	1 : Bajo [mM]	2 : Medio [mM]	3 : Alto [mM]
Ácido Acético	4.1	8.2	16.4
Ácido benzoico	0.35	0.7	1.4
Ácido caftárico	0.05	0.1	0.2
Ácido cítrico	1.3	2.6	5.2
Ácido fórmico	1.05	2.1	4.2
Acido fumárico	0.05	0.1	0.2
Ácido galacturónico	2.3	4.6	9.2
Ácido gálico	0.15	0.3	0.6
Ácido glucónico	1.25	2.5	5
Ácido láctico	5.65	11.3	22.6
Ácido málico	3.3	6.6	13.2
Ácido pirúvico	0.3	0.6	1.2
Ácido salicílico	0.35	0.7	1.4
Ácido shikímico	0.15	0.3	0.6
Ácido sórbico	0.4	0.8	1.6
Ácido tartárico	8.3	16.55	33.1
Alanina	0.55	1.1	2.2
Arabinosa	1.65	3.3	6.6
Arginina	1.45	2.9	5.8
Cadaverina	0.05	0.1	0.2
Epicatequina	0.1	0.2	0.4
Fructosa	2.8	5.6	11.2
Furfural	0.1	0.2	0.4
GABA	1	2	4
Glucosa	2.75	5.5	11
HMF	0.05	0.1	0.2
Lactato de etilo	1.3	2.6	5.2
Metanol	3.15	6.3	12.6
Prolina	4.35	8.7	17.4
Putrescina	0.05	0.1	0.2
Sacarosa	0.75	1.5	3
Trigonelina	0.15	0.3	0.6

En la Tabla 13 (Anexo II) se presentan con detalle las alícuotas de disolución madre adicionadas de cada compuesto para preparar un mililitro de mezcla.

4.2.4 Vinos

Se analizaron dos vinos de Querétaro de dos variedades de uva distintas: Pinot Noir y Merlot. Se tomaron 900 microlitros de cada vino directamente de la botella y se ajustó el pH a 3.10 ± 0.02 tal como se describe en la siguiente sección.

4.2.5 Ajuste de pH

Las disoluciones utilizadas en los experimentos de RMN fueron preparadas en cryoviales de 2 mL marca Simport modelo T309-2a. Todas las muestras utilizadas en la presente investigación contenían 600 μL de analito disuelto en EtOH/H₂O al 12% más 300 μL de D₂O (a excepción de las muestras de vino). El pH de la disolución resultante se ajustó a 3.10 ± 0.02 con una unidad de titulación automática (BTpH, Bruker), que adiciona 100 μL de buffer (1M KH₂PO₄, 0.1 % de TSP, D₂O 99.98%) y ajusta el pH utilizando HCl 1N y NaOH concentrado. Finalmente, 600 μL de la disolución con pH ajustado se transfirieron al tubo de RMN de 5 mm.

4.2.6 Problemas en la preparación de muestras

Durante el ajuste de pH de las 15 mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar se observó un precipitado de color blanco en las mezclas 1, 5, 9, 11, 12 y 15 que corresponden a las mezclas con los niveles de concentración 4 y 5 de ácido tartárico. Debido a esto, en las mezclas de 37 compuestos el nivel medio de concentración de ácido tartárico se disminuyó de 33.1 mM a 16.55 mM con la intención de evitar el precipitado.

Por otra parte, se encontró una contaminación de metanol en el reactivo de etanol utilizado para la preparación del disolvente (etanol/agua 12%), lo cual dificultó la cuantificación del metanol en las mezclas de 12 compuestos debido a que el volumen utilizado de disolvente en cada mezcla fue distinto (Tabla 12).

4.3 Cuantificación utilizando el software MestreNova

En los espectros de las mezclas de 12 compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar se cuantificó mediante el software MestreNova calculando el área de todas las señales (utilizando el método “Suma”). La cuantificación de los compuestos se realizó utilizando los valores de área de los espectros de concentración conocida de la biblioteca (2.5 mM), la ecuación (4.1) describe el método de cálculo:

$$C_{i,mezcla} = \frac{A_{i,mezcla} * 2.5mM}{A_{i,biblio}} \quad (4.1)$$

donde $C_{i,mezcla}$ es la concentración del compuesto i en la mezcla, $A_{i,mezcla}$, $A_{i,biblio}$ es el área absoluta del compuesto i en la mezcla y en la biblioteca respectivamente.

4.4 ASICS

4.4.1 Importación de espectros

Los espectros procesados fueron almacenados en archivos csv, posteriormente se importaron a ASICS versión v.2.8.0 sin realizar ninguna otra modificación.

4.4.2 Creación de la biblioteca de espectros

Para la construcción de la biblioteca de espectros RMN-¹H se seleccionaron 38 compuestos usualmente reportados en muestras de vino (Tabla 1) a una concentración representativa (dentro del rango encontrado en vinos). [28,33]

De acuerdo con lo mencionado en la sección 3.4, ASICS requiere que todos los compuestos puros de la biblioteca sean adquiridos con la misma concentración para poder realizar cuantificaciones absolutas. La concentración seleccionada para los espectros de la biblioteca fue de 2.5 mM, misma que se aproxima a la mediana de las concentraciones reportadas.

A cada espectro de la biblioteca se le asignó su correspondiente número de protones (Tabla 6), dado que es otro requisito de ASICS para poder cuantificar.

4.4.3 Parámetros de procesamiento

El funcionamiento de ASICS depende de distintos parámetros seleccionados por el usuario, a continuación, se explican brevemente algunos de ellos así como el valor que se asignó.

Los **umbrales** (*threshold*) de los espectros de la biblioteca y de las mezclas a cuantificar indican el valor de intensidad a partir del cual las señales son consideradas en el análisis. El umbral definido para la biblioteca de espectros fue de 0.01 mientras que para las mezclas a cuantificar se probaron dos valores (0.005 y 0.01) con el objetivo de analizar el efecto en la identificación de ASICS, debido a que en las mezclas muchos compuestos se

presentan en muy baja concentración y por lo tanto presentan señales de poca intensidad que en algunos casos pueden quedar debajo del umbral. Cabe destacar que disminuir el valor del umbral aumenta la probabilidad de que se consideren en el análisis señales de ruido o de impurezas de baja concentración, que afectan en gran medida los resultados de la identificación.

Se definieron tres **regiones de exclusión**, en las que se aplicó la supresión de la señal de agua [5.000-4.660 ppm] y de las señales de etanol ([3.760-3.510] ppm, [1.280-1.050] ppm).

Otro parámetro relevante es el **máximo desplazamiento químico permitido**. Con este parámetro definimos el intervalo de desplazamiento químico en el cual la señal de un compuesto puede ser encontrada por ASICS. Por ejemplo, para la señal de un compuesto de la biblioteca que se ubica en d ppm, ASICS la identificara siempre y cuando se encuentre dentro del intervalo [$d-M$, $d+M$] ppm, donde M es el máximo desplazamiento químico permitido. En la presente investigación se utilizó un valor de $M=0.03$ ppm.

Si bien ASICS cuenta con distintos métodos de cuantificación, el utilizado en la presente investigación fue el método “**FWER**” (Family Wise Error Rate; existente desde la primera versión de ASICS y ha sido optimizado en versiones subsecuentes) que realiza cuantificaciones independientes. El uso de este método permite que los resultados sean independientes del orden en que se importan los espectros a R.

4.4.4 Función ASICS, identificación y cuantificación

Utilizando los parámetros descritos en la sección anterior se realizó la identificación y cuantificación con ASICS. En la Figura 1 se muestra un ejemplo del script utilizado para la ejecución de la función ASICS, además, se agrega una pequeña descripción de cada argumento.

```

Cuantificación<- ASICS(EspectrosMezclas, #Espectros de mezclas a cuantificar
exclusion.areas = SupZones, #Matriz que incluye las zonas de exclusión
max.shift = 0.03, #Máximo desplazamiento químico permitido
pure.library = Purelib, #Biblioteca de espectros
noise.thres = 0.01, #Umbral en las mezclas
joint.align = FALSE, #Opción relevante al usar otros métodos de cuantificación
quantif.method = c("FWER"), #Método de cuantificación
seed = 1234, #Controla la aleatoriedad del algoritmo
verbose = TRUE) #Imprime el proceso del método

```

Figura 1. Script utilizado para ejecutar la función ASICS. Se muestran los valores asignados para cada argumento de la función.

Al ejecutar la función ASICS se inicia el proceso de identificación y cuantificación descritos en la sección 3.4. Durante la ejecución de la función se muestra en la consola de RStudio (IDE para R) el porcentaje de avance en cada etapa del método (Figura 2). El archivo que se obtiene contiene las cuantificaciones, así como los espectros modelados de los compuestos identificados.

```

Remove areas from spectrum and library
|=====| 100%

Compute weights
|=====| 100%

Remove metabolites that cannot belong to the mixture
|=====| 100%

Translate library
|=====| 100%

Deform library peaks
|=====| 100%

Compute quantifications
|=====| 100%

Format global results...
> |

```

Figura 2. Mensajes de salida en la consola de RStudio al finalizar la identificación y cuantificación con ASICS.

4.4.5 Cuantificación absoluta

Con ASICS se obtienen cuantificaciones relativas de los compuestos identificados, para obtener cuantificaciones absolutas se utilizó la ecuación (4.2):

$$C_{i,abs} = \frac{C_{i,rel} * 0.57mM}{C_{TSP,rel}} \quad (4.2)$$

donde $C_{i,abs}$, $C_{i,rel}$ es la concentración absoluta y relativa calculada por ASICS del compuesto i respectivamente, $C_{TSP,rel}$ es la concentración relativa del TSP en la mezcla

calculada por ASICS y 0.57 mM es la concentración del estándar interno TSP en los espectros de la mezcla.

4.4.6 Evaluación de la identificación de ASICS

Para evaluar el desempeño de ASICS se calculó el porcentaje de exactitud en la identificación usando la siguiente clasificación:

- Verdadero positivo: La identificación es correcta dado que indica de forma correcta la presencia de un compuesto
- Verdadero negativo: La identificación es correcta dado que indica de forma correcta la ausencia de un compuesto.
- Falso positivo: La identificación es incorrecta dado que indica la presencia de un compuesto que no está presente.
- Falso negativo: La identificación es incorrecta dado que indica la ausencia de un compuesto que si está presente.

La ecuación (4.3) describe el método de cálculo del porcentaje de exactitud en la identificación de ASICS.

$$Exactitud [\%] = \frac{(\text{Verdaderos Positivos} + \text{Verdaderos Negativos}) * 100}{(\text{compuestos totales de la biblioteca})} \quad (4.3)$$

5. Análisis de resultados

5.1 RMN de mezclas

Los espectros de RMN-¹H de dos mezclas se presentan en la Figura 3. En la Figura 3A se muestra el espectro con la asignación de las señales de una mezcla de 12 compuestos cuyas señales no se traslapan. En la Figura 3B, se muestra el espectro de una mezcla de 38 compuestos donde la mayoría de las señales se encuentran traslapadas total o parcialmente. En ambos espectros se encuentra indicada la señal del TSP (estándar interno) a 0.00 ppm y las zonas que se suprimieron (señales de agua y etanol) y que fueron excluidas del análisis. Cabe resaltar que en el segundo espectro es necesario aplicar un método de desconvolución para el cálculo de las integrales debido al traslape de las señales.

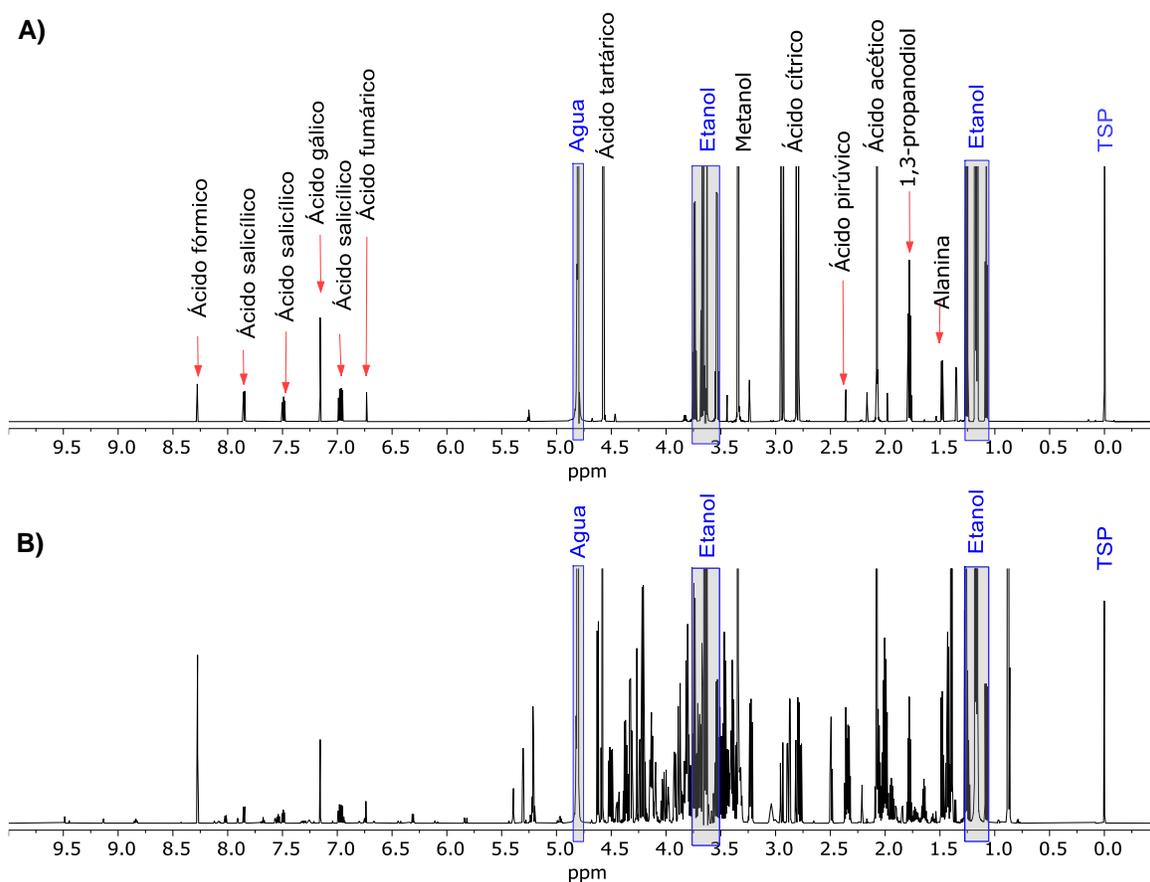


Figura 3. Espectros de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de: A) Mezcla de 12 compuestos con señales sin traslapar B) Mezcla de 38 compuestos con señales traslapadas. Se indican en un recuadro las zonas de supresión y con una flecha el compuesto asociado a cada señal.

5.2 Señales seleccionadas para la biblioteca

Los 38 compuestos seleccionados para conformar la biblioteca de ASICS presentan una o más señales de RMN-¹H, las señales que se utilizaron para crear la biblioteca se muestran en la Tabla 6, mismas que fueron seleccionadas considerando que no se encontraran cerca de las regiones de supresión. Para el caso específico de compuestos con un número de señales mayor a 3 la selección se realizó con base en el comportamiento de ASICS, es decir, se probó realizar la identificación con las señales del compuesto y se seleccionaron aquellas con las que se obtenían mejores resultados.

Tabla 6. Desplazamiento químico ¹H, multiplicidad, constante de acoplamiento J_{HH} y número de protones de las señales consideradas para la cuantificación de los compuestos.

N°	Compuesto	δ ¹ H en ppm (multiplicidad, J en Hz, asignación)	No. protones
1	1,3-propanodiol	1.78 (p, 6.49, CH ₂)	2
2	2-metilpropanol	0.87 (d, 6.73, CH ₃); 1.73 (m, 6.62, CH)	8
3	3-metilbutanol	0.88 (d, 6.67, CH ₃); 1.43 (q, 6.91, CH ₂); 1.64 (m, 6.80, CH)	9
4	Acetato de etilo	2.07 (s, CH ₃); 4.13 (q, 7.16, CH ₂)	5
5	Acetoína	1.36 (d, 7.15, CH ₃); 2.21 (s, CH ₃)	6
6	Ácido acético	2.08 (s, CH ₃)	3
7	Ácido benzoico	7.54 (m, 2CH); 7.68 (m, CH); 8.02 (m, 2CH)	5
8	Ácido caftárico	5.43 (d, 2.31, CH); 6.43 (d, 15.94, CH); 6.94 (d, 8.22, anillo); 7.69 (d, 15.96, CH)	4
9	Ácido cítrico	2.80 (d, 15.63, CH); 2.94 (d, 15.68, CH)	4
10	Ácido fórmico	8.27 (s, HCOOH)	1
11	Ácido fumárico	6.74 (s, CH)	2
12	Ácido galacturónico	4.58 (d, 7.88, CH); 5.30 (d, 3.82, CH)	1
13	Ácido gálico	7.15 (s, C ₂ H, C ₆ H, anillo)	2
14	Ácido glucónico	4.10 (dd, 2.88; 3.89, CH), 4.35 (d, 4.35, CH)	2
15	Ácido láctico	1.39 (d, 6.99, CH ₃); 4.33 (q, 7.01, CH)	4
16	Ácido málico	2.78 (dd, 7.25; 16.36, CH); 2.88 (dd, 4.50; 16.37, CH)	2
17	Ácido pirúvico	2.36 (s, CH ₃)	3
18	Ácido salicílico	7.85 (m, CH)	1
19	Ácido shikímico	6.80 (m, CH)	1
20	Ácido sórbico	1.84 (m, CH ₃); 5.83 (d, 14.92, CH)	4
21	Ácido tartárico	4.58 (s, CH)	2
22	Alanina	1.48 (d, 7.25, CH ₃)	3
23	Arabinosa	4.49 (d, 7.76, CH); 5.22 (dd, 3.15; 6.69, CH)	1
24	Arginina	1.69 (m, CH ₂); 1.91 (m, CH ₂); 3.23 (m, CH ₂)	6
25	Cadaverina	1.45 (p, 7.58, CH ₂); 1.70 (p, 7.73, CH ₂)	6
26	Epicatequina	6.10 (m, 2CH); 6.94 (m, 2CH); 7.04 (m, CH)	5
27	Fructosa	3.78 (m), 3.87 (m), 3.97 (m), 4.01 (m), 4.08 (m)	4

N°	Compuesto	$\delta^1\text{H}$ en ppm (multiplicidad, J en Hz, asignación)	No. protones
28	Furfural	9.49 (d, 0.94, CH)	1
29	GABA	1.94 (m, CH ₂); 2.49 (t, 7.27, CH ₂)	4
30	Glucosa	4.62 (d, 7.94, CH); 5.21 (d, 3.75, CH)	4
31	HMF	9.45 (s, CH)	1
32	Lactato de etilo	1.39 (d, 6.94, CH ₃); 4.21 (q, 7.16, CH ₂); 4.37 (q, 6.98, CH)	6
33	Metanol	3.34 (s, CH ₃)	3
34	Prolina	2.00 (m, CH ₂); 2.06 (m, CH); 2.34 (m, CH)	4
35	Putrescina	1.75 (m, CH ₂)	4
36	Sacarosa	4.03 (t, 8.58, CH); 4.19 (d, 8.73, CH); 5.39 (d, 3.83, CH)	3
37	Trigonelina	8.08 (m, CH); 8.84 (m, 2CH); 9.14 (CH)	4
38	TSP	0.00 (s, CH ₃)	9

5.3 Exclusión del acetaldehído en los análisis

En la Figura 5 se muestra el espectro de RMN-¹H del acetaldehído en H₂O/EtOH. En la región de 9.68-5.20 ppm se observan distintas señales con la misma multiplicidad (cuádruples) mientras que en la región de 2.24-1.29 ppm se observan dobletes, lo que indica la existencia de varios equilibrios. Se ha reportado que el acetaldehído se hidrata en disolución acuosa [34,35], tal como se presenta en la Figura 4, lo cual genera las señales de 5.26 y 1.35 ppm.

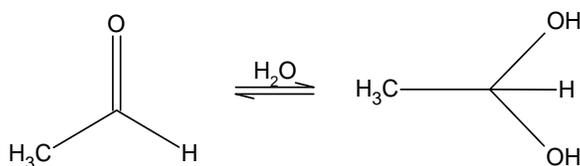


Figura 4. Equilibrio de hidratación del acetaldehído

Se trató de cuantificar con las señales de 9.66 ppm y 2.23 ppm (Figura 5) que corresponden al acetaldehído puro; sin embargo, al realizar el análisis a diferentes tiempos se observó que su intensidad no era constante. Se desconoce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre las distintas especies en solución hidroalcohólica, además de que en vinos solo se observan las señales del acetaldehído puro (9.66 y 2.23 ppm). Por lo tanto, la cuantificación del acetaldehído mediante este método fue descartada y el espectro de acetaldehído fue eliminado de la biblioteca de ASICS.

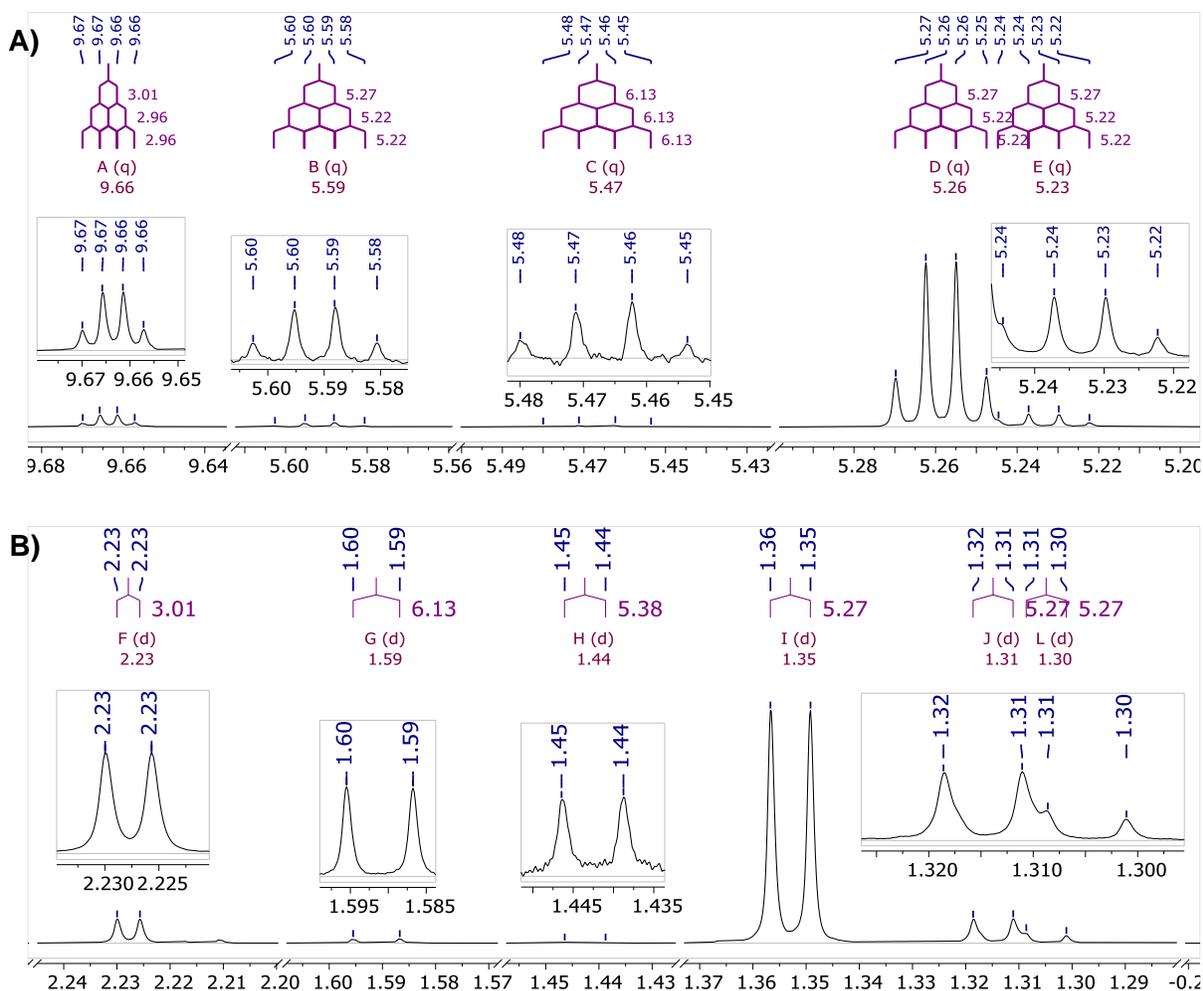


Figura 5. Expansiones de espectro de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) del acetaldehído en disolución hidroalcohólica a pH=3.1. A) Expansión de 9.69-5.20 ppm. B) Expansión de 2.25-1.28 ppm. Se indica las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

5.4 Evaluación de ASICS en la identificación y cuantificación

5.4.1 Mezcla de compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar. Comparación con cálculo manual.

5.4.1.1 Resultados usando un umbral en mezclas de 0.005

En las tablas del Anexo III se muestran los resultados de cuantificación de forma manual utilizando las integrales obtenidas con MestreNova y con ASICS, se presentan los errores relativos a la concentración gravimétrica. Se observa que ASICS logró identificar de manera correcta los compuestos en la mayoría de las mezclas, no obstante, ocurrieron

errores que se discutirán más adelante. En la Tabla 7 se presenta el porcentaje de exactitud en la identificación de ASICS para cada una de las 15 mezclas. El promedio de porcentaje de exactitud fue del $92.81\% \pm 5.38\%$. Cabe destacar que los falsos positivos fueron el tipo de error que predominó en la identificación.

Tabla 7. Exactitud en la identificación de ASICS (umbral en mezclas de 0.005)

Mezcla	Verdadero positivo	Falso positivo	Falso negativo	Verdadero negativo	Exactitud [%]
1	11	5	1	21	84.21
2	12	2	0	24	94.74
3	12	3	0	23	92.11
4	12	1	0	25	97.37
5	12	6	0	20	84.21
6	11	0	1	26	97.37
7	12	0	0	26	100.00
8	12	1	0	25	97.37
9	12	2	0	24	94.74
10	12	3	0	23	92.11
11	9	3	3	23	84.21
12	12	6	0	20	84.21
13	11	1	1	25	94.74
14	12	1	0	25	97.37
15	12	1	0	25	97.37

Las cuantificaciones calculadas con ASICS se compararon con las calculadas de forma manual. En la Figura 6 se muestran las gráficas de ambas cuantificaciones vs la concentración gravimétrica. Se presenta el modelo lineal y el coeficiente de r^2 para ambos métodos; además, se muestra una línea con pendiente uno y ordenada cero que facilita ver si las cuantificaciones fueron sobreestimadas o subestimadas. Para evaluar la exactitud de las cuantificaciones se utilizó el porcentaje de error respecto a la concentración gravimétrica (Anexo III); se observa que las cuantificaciones realizadas de forma manual subestiman el valor real y presentan en promedio un menor porcentaje de error y de desviación estándar ($-10.6\% \pm 8.6\%$), mientras que las cuantificaciones con ASICS sobreestiman el valor real y presentan un mayor porcentaje de error y de desviación estándar ($+17.1\% \pm 11.5\%$), sin considerar en el cálculo al ácido tartárico y el ácido salicílico, ya que mostraron valores inusuales en el error. En la mayoría de los casos se observó un comportamiento lineal con ambos métodos de cuantificación ($r^2 >$

0.96); no obstante, la cuantificación del ácido tartárico fue la excepción. La baja relación lineal fue causada por la precipitación de este compuesto en algunas mezclas (tal como se mencionó en la sección 4.2.6), lo que originó que la concentración en las mezclas no coincidiera con las concentraciones gravimétricas, especialmente aquellas con los niveles 4 y 5 de concentración. Además, se observó en los espectros de algunas mezclas una distorsión en la línea base cerca de la región de supresión del agua (4.8 ppm) que pudo haber afectado la intensidad de la señal del ácido tartárico (4.6 ppm).

Respecto a la cuantificación del ácido salicílico y de la alanina, se realizaron cuantificaciones utilizando la integral de diferentes señales y se observó que al utilizar un menor número de señales la relación lineal de las cuantificaciones de ASICS mejora (aumento en el valor de r^2), mientras que por el método de integrales no se ve afectado.

La cuantificación del ácido fumárico presentó el menor coeficiente de correlación r^2 (≈ 0.96) con ambos métodos. Se observa que los niveles de concentración de este compuesto son los más bajos (nivel medio de 0.1 mM) por lo que pequeñas desviaciones en el volumen final de las muestras pudo generar cambios en la concentración.

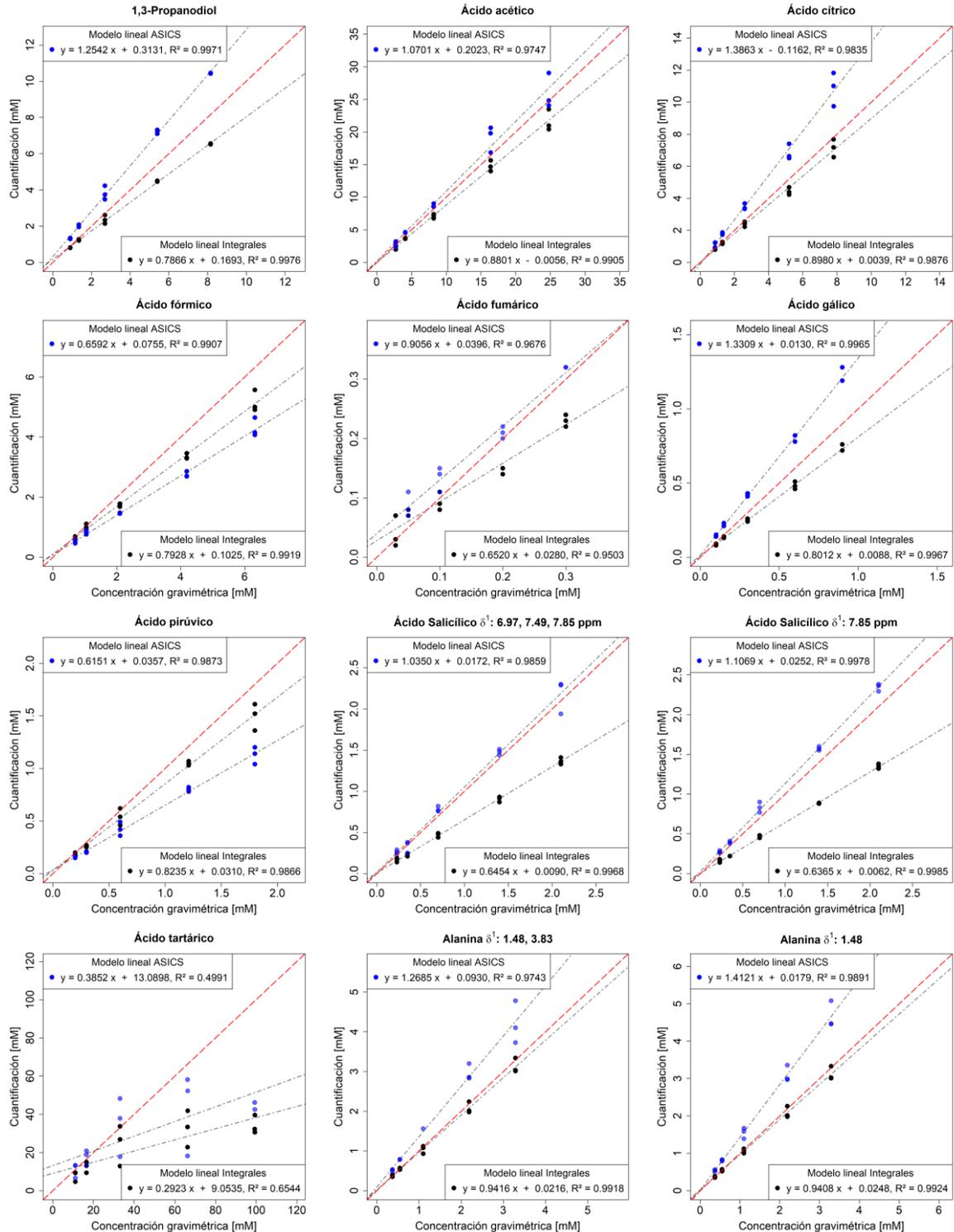


Figura 6. Gráficas de cuantificación (ASICS y manual con integral) vs concentración gravimétrica. Se presenta el modelo lineal para ambos casos, así como el respectivo coeficiente de R². También se muestra en cada caso una línea color rojo de pendiente uno y ordenada cero.

5.4.1.2 Resultados usando un umbral en mezclas de 0.01

La identificación de ASICS también fue evaluada utilizando un umbral de 0.01 en las mezclas (Tabla 8). El promedio de la exactitud en la identificación fue del $95.44\% \pm 3.01\%$ el cual es mayor con respecto a la evaluación utilizando un umbral de 0.005. Este aumento en el porcentaje de exactitud se debe a que ASICS detecta menos señales de ruido e impurezas evitando que sean identificadas como señales de otros compuestos, generando una disminución en el número de falsos positivos.

Tabla 8. Exactitud de la identificación de ASICS (umbral en las mezclas de 0.01).

Mezcla	Verdadero positivo	Falso positivo	Falso negativo	Verdadero negativo	Exactitud [%]
1	10	1	2	25	92.11
2	12	1	0	25	97.37
3	12	2	0	24	94.74
4	12	1	0	25	97.37
5	12	4	0	22	89.47
6	11	0	1	26	97.37
7	12	0	0	26	100.00
8	12	1	0	25	97.37
9	12	1	0	25	97.37
10	12	2	0	24	94.74
11	9	1	3	25	89.47
12	12	2	0	24	94.74
13	11	1	1	25	94.74
14	12	2	0	24	94.74
15	12	0	0	26	100.00

Respecto a las cuantificaciones absolutas, la mayoría fue similar con los dos umbrales (0.005 y 0.01) por lo que los resultados del Anexo III también aplican en este caso. La única excepción ocurrió con la cuantificación del ácido cítrico en la mezcla 1 y 8, donde la identificación fue errónea y la cuantificación se modificó de 0.93 mM a 0.40 mM en la mezcla 1 y de 11.82 mM a 6.35 mM en la mezcla 8.

5.4.2 Mezcla de compuestos con señales de RMN-¹H traslapadas

5.4.2.1 Resultados usando un umbral en mezclas de 0.005

En el anexo IV se presentan las cuantificaciones realizadas por ASICS así como el porcentaje de error relativo a la concentración gravimétrica en las 9 mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H traslapadas. También se presenta un gráfico de cuantificación de ASICS vs concentración gravimétrica y el modelo lineal para cada metabolito. El promedio del porcentaje de exactitud en la identificación de ASICS (Tabla 9) fue de 80.70% ± 4.47%, el cual es menor respecto al promedio calculado en la sección anterior para el caso de las mezclas de compuestos con señales de RMN-¹H sin traslapar, esto indica que el traslape de las señales genera más errores durante el proceso de identificación. Cabe destacar que el número de falsos positivos y verdaderos negativos en todos las mezclas con señales traslapadas es de cero puesto que los compuestos que componen las mezclas son los mismos que contiene la biblioteca.

Tabla 9. Exactitud en la identificación de ASICS (umbral en mezclas de 0.005).

Mezcla	Verdadero positivo	Falso positivo	Falso negativo	Verdadero negativo	Exactitud [%]
1	31	0	7	0	81.58
2	32	0	6	0	84.21
3	32	0	6	0	84.21
4	33	0	5	0	86.84
5	32	0	6	0	84.21
6	30	0	8	0	78.95
7	28	0	10	0	73.68
8	28	0	10	0	73.68
9	30	0	8	0	78.95

El error de las cuantificaciones de ASICS varió de compuesto a compuesto y también de mezcla a mezcla. El error promedio tomando en cuenta solo las señales que fueron detectadas correctamente para cada uno de los 37 compuestos fue del 43.96% ± 41.47%. Cabe destacar que en la mayoría de los casos (29 compuestos) las cuantificaciones fueron sobreestimadas mientras que en 6 compuestos las cuantificaciones fueron subestimadas.

Respecto al comportamiento lineal en las cuantificaciones, 17 compuestos presentaron un coeficiente de correlación r^2 mayor a 0.99, otros 12 un coeficiente de correlación $0.96 \leq$

$r^2 < 0.99$, y solo 3 presentaron un coeficiente de correlación menor a 0.96. Para el caso del 2-metilpropanol, cadaverina, HMF y putrescina no se logró calcular un modelo lineal puesto que no se identificaron en la mayoría de las mezclas.

El único compuesto que no fue detectado durante el paso de limpieza de la biblioteca (ver sección 3.4) fue el ácido caftárico, por lo que no se obtuvo información acerca de su concentración en estos 9 experimentos.

5.4.2.2 Resultados usando un umbral en mezclas de 0.01

Se probó utilizar un umbral en mezclas de 0.01, los resultados de cuantificación e identificación fueron idénticos a los presentados en las tablas del Anexo IV que corresponden a un umbral de 0.005. La invariabilidad de las cuantificaciones respecto al umbral seleccionado (0.005 o 0.01) indica que las señales de los compuestos presentes en las mezclas tienen una intensidad mayor a estos valores de umbral y por consiguiente son detectadas por el algoritmo de ASICS.

5.4.3 Muestras de Vinos

El espectro de RMN-¹H de un vino tinto Pinot Noir se muestra en la Figura 7A, en la que se señalan en un recuadro las zonas de supresión de agua y etanol. Al comparar el espectro del vino con el espectro de una mezcla de 38 metabolitos (Figura 7B), se confirma que la muestra de vino es mucho más compleja ya que se observan más señales de otros metabolitos, además, las señales en la región de 3.00 a 5.50 ppm son tantas que no se observa la línea base. El espectro modelado por ASICS (gráfica de la ecuación (3.17)) del vino tinto Pinot Noir se muestra en la Figura 7C, en donde se observa que ninguna de las señales del espectro modelado se posiciona en la zona de exclusión de agua y etanol. Al comparar el espectro experimental (Figura 7A) y el modelado (Figura 7C) se observa que el modelado contiene un menor número de señales, incluso menos que al número esperado de las señales de los 38 metabolitos almacenados en la biblioteca (Figura 7B).

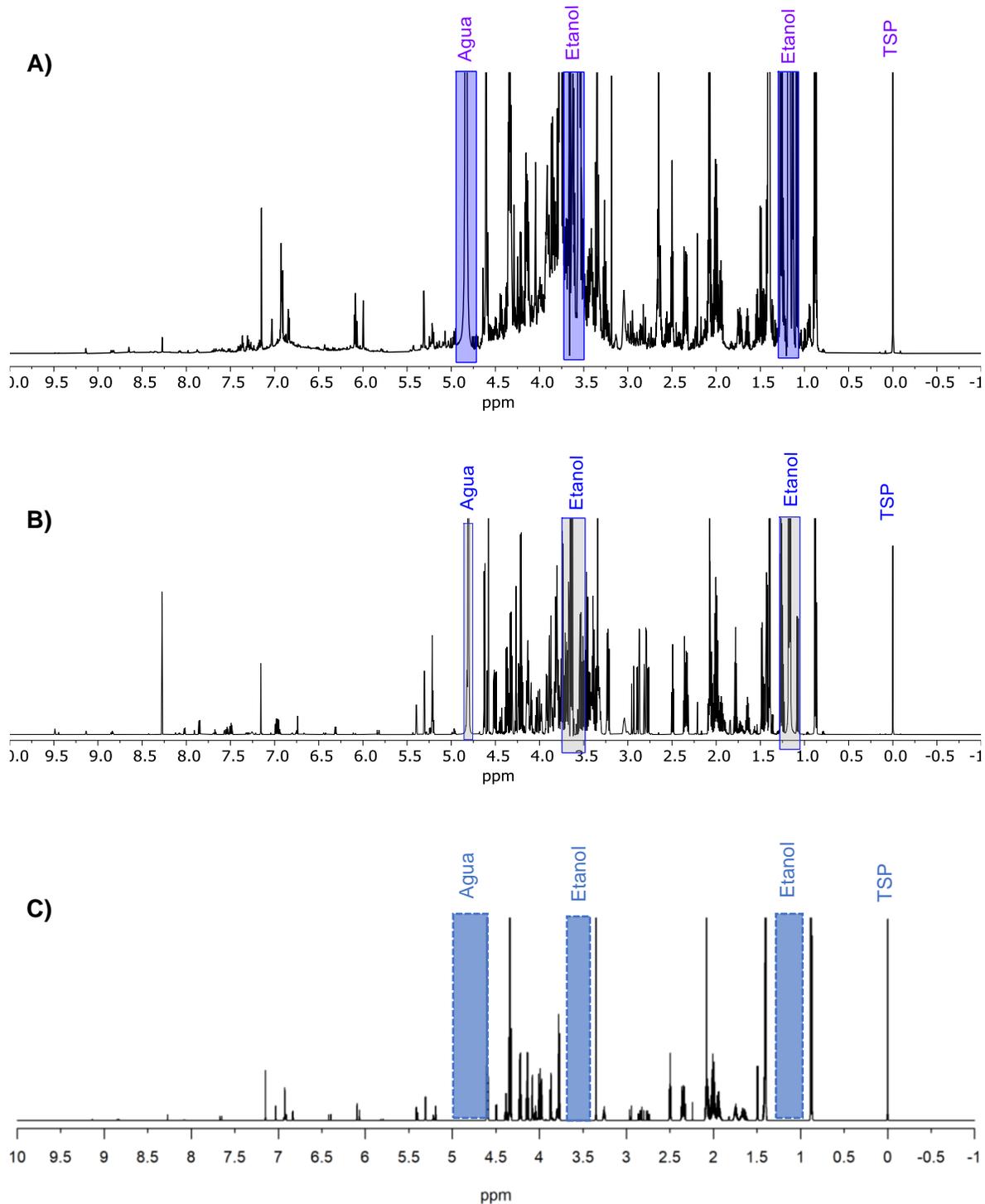


Figura 7. A) Espectro de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 9:1) del vino Pinot Noir. B) Espectro modelado por ASICS del vino Pinot Noir. C) Espectro de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) de una mezcla de 38 metabolitos.

Para evaluar ASICS se compararon los espectros reales y modelados de dos muestras de vino, se consideró una cuantificación correcta cuando las señales modeladas y las del

espectro experimental coinciden en desplazamiento químico, intensidad y ancho. El umbral utilizado para los espectros de los vinos fue de 0.005 con el objetivo de identificar el mayor número de metabolitos posibles.

De los 32 compuestos identificados por ASICS en el vino Pinot Noir solo 15 fueron modelados correctamente, lo que equivale al 46.87% de exactitud. Respecto al vino Merlot, de los 33 compuestos identificados solo 10 fueron modelados correctamente, lo que equivale al 30.30% de exactitud. Después de confirmar visualmente los metabolitos que fueron identificados satisfactoriamente con ASICS, se procedió a realizar la cuantificación manual con desconvolución utilizando el software MestreNova. Los resultados de ambos métodos de cuantificación para el vino Pinot Noir y el Merlot se muestran en la Tabla 10 y Tabla 11, respectivamente. Se observa que el error de ASICS relativo a las cuantificaciones con desconvolución no es constante y varía en un amplio intervalo. El error de ASICS en la cuantificación de la epicatequina y la prolina fueron mayores que los encontrados en la cuantificación de las mezclas de 38 metabolitos (Tabla 50 y Tabla 58), se presume que este fenómeno se debe a que el área de las señales de estos compuestos se incrementa por la presencia de otras señales de baja intensidad ubicadas en la misma región del espectro.

Tabla 10. Cuantificación de metabolitos del vino Pinot Noir calculada con ASICS y con el método de integral por desconvolución. El error relativo es el de la cuantificación con ASICS respecto a la calculada manualmente con integrales por desconvolución.

Compuesto	ASICS [mM]	Desconvolución [mM]	Error [%]
Ácido acético	9.51	9.90	-3.94
Ácido cítrico	0.41	0.44	-6.82
Ácido fórmico	0.16	0.29	-44.83
Ácido galacturónico	5.12	4.76	7.56
Ácido gálico	0.70	0.50	40.00
Ácido láctico	26.76	42.41	-36.90
Ácido pirúvico	0.22	-----	-----
Ácido tartárico	3.12	5.51	-43.38
Alanina	1.18	0.90	31.11
Arabinosa	1.67	1.19	40.34
Epicatequina	1.06	0.53	100.00
GABA	2.29	1.62	41.36
Prolina	10.54	4.84	117.77
Trigonelina	0.13	0.12	8.33

Tabla 11. Cuantificación de metabolitos del vino Merlot calculada con ASICS y con el método de integral por desconvolución. El error relativo es el de la cuantificación con ASICS respecto a la calculada manualmente con integrales por desconvolución.

Compuestos	ASICS [mM]	Desconvolución [mM]	Error [%]
3-metilbutanol	2.66	3.20	-16.87
Ácido galacturónico	14.28	14.06	1.56
Ácido gálico	0.94	0.63	49.20
Ácido láctico	11.86	23.68	-49.91
Alanina	1.62	1.12	44.64
Arabinosa	5.35	4.29	24.71
Epicatequina	0.59	0.39	51.28
Prolina	48.55	23.41	107.39
Trigonelina	0.18	0.15	20.00

5.4.4 Errores en el modelado de ASICS

Al analizar las señales modeladas por ASICS de las mezclas se encontraron diversos errores que se pueden clasificar en tres categorías: **a)** error en la asignación del desplazamiento químico, **b)** error en el ajuste de intensidad y ancho de las señales, **c)** errores relacionados con los parámetros de ASICS. En la siguiente sección se describen algunos errores representativos de cada categoría y en el Anexo V se muestran más ejemplos, donde se puede observar que en muchos casos los errores presentados fueron múltiples, por lo que pueden clasificarse en varias categorías. En general, el error que se presentó con más frecuencia fue el relacionado con la asignación del desplazamiento químico.

5.4.4.1 Error en la asignación del desplazamiento químico

5.4.4.1.1 Ácido tartárico (mezclas con señales sin traslapar)

Uno de los compuestos que presentó el error en la asignación del desplazamiento químico fue el ácido tartárico. En la Figura 8A, se muestra el espectro de ácido tartárico de la biblioteca superpuesto con el espectro de la mezcla 11, se observa que la distancia entre la señal de la biblioteca y el real es de 0.053 ppm, esta diferencia supera el límite permitido de 0.03 ppm y por lo tanto no pudo haber sido identificada. Al revisar el espectro modelado por ASICS (Figura 8B), se observa que la señal modelada se posiciona erróneamente en 4.601 ppm que corresponde con el desplazamiento químico de un

singlete proveniente de una impureza, lo anterior implica una gran desventaja en el uso de ASICS como herramienta de identificación y cuantificación puesto que los metabolitos que solo cuenten con un singlete podrán ser confundidos con compuestos que presenten otros singletes.

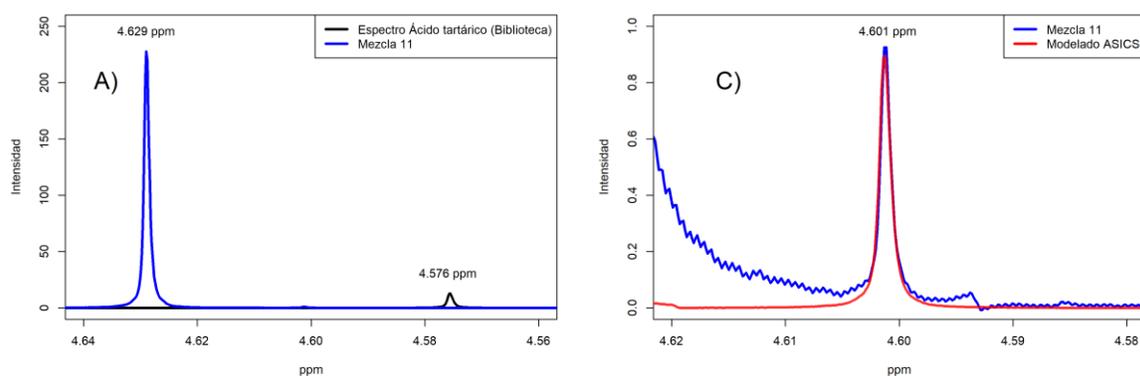


Figura 8. Expansión de los espectros de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) de la mezcla 11 (azul) superpuesto con: A) Espectro de ácido tartárico de la biblioteca (negro). B) Espectro modelado con ASICS (rojo). Se indica el desplazamiento químico de las señales.

5.4.4.1.2 Alanina (mezclas con señales sin traslapar)

La alanina se cuantificó utilizando las señales de 3.83 ppm y 1.48 ppm (Tabla 24 Anexo III), la identificación no logró realizarse en las mezclas 6, 7 y 11 además de que no se detectó correctamente en las mezclas 1, 2, 5, 10. Este problema se debe a la dificultad de ASICS para modelar y ajustar el desplazamiento químico del cuadruplete de 3.83 ppm, como ejemplo se muestra dicha señal de la mezcla 2 y 5 superpuesto con sus correspondientes espectros modelados (Figura 9).

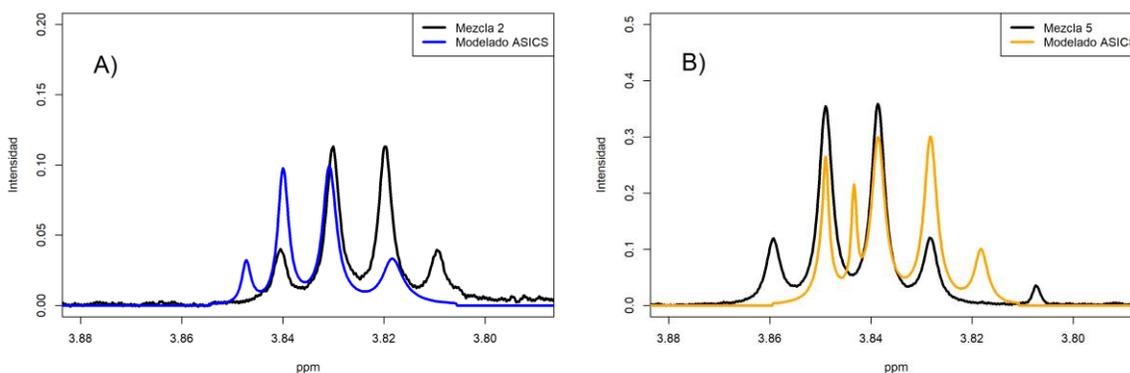


Figura 9. Expansión de espectro de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de: A) Mezcla 2 (negro), B) Mezcla 5 (negro). Ambos superpuestos con el modelado de ASICS.

Al eliminar el cuadruplete de 3.83 ppm del espectro de alanina de la biblioteca de ASICS dejando solo el doblete de 1.48 ppm la identificación se realiza con éxito en todas las mezclas (Tabla 25 Anexo III).

5.4.4.1.3 2-Metilpropanol (mezclas con señales traslapadas)

La identificación del 2-metilpropanol fue una de las más problemáticas en los espectros con señales traslapadas ya que solo se detectó correctamente en la mezcla 1 (Tabla 27, Anexo IV). En la Figura 10 A y B se muestra el espectro de la mezcla 2 superpuesto con el correspondiente espectro modelado y de la biblioteca, se observa que la identificación no tuvo éxito puesto que el doblete (0.866 ppm) y el multiplete (1.730 ppm) del espectro modelado se posicionan en un desplazamiento químico incorrecto. En la Figura 10C se observa que una de las señales del doblete no se alinea con ninguna señal. El mismo problema ocurrió con las mezclas 3, 4, 5, 8, 9.

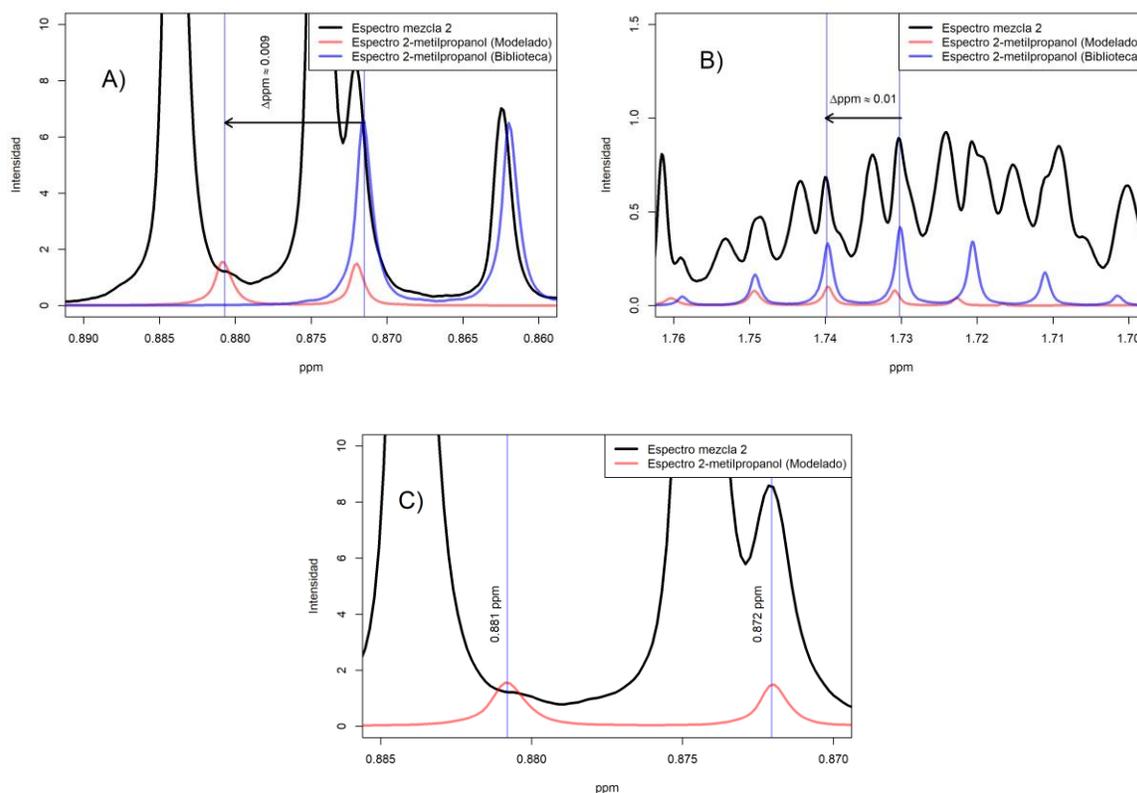


Figura 10. Expansión del espectro de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) de la mezcla 2 superpuesto con: A) Espectro alineado y de la biblioteca de 2-metilpropanol de 0.86-0.89 ppm; B) Espectro alineado y de la biblioteca de 2-metilpropanol de 1.70-1.76 ppm; C) Espectro de 2-metilpropanol alineado.

Al analizar el espectro de la mezcla 6 se observa que el espectro modelado del doblete del 2-metilpropanol se posiciona en 0.88 ppm que corresponde con el desplazamiento químico de la señal del 3-metilbutanol (Figura 11 A y B). Respecto al multiplete modelado de 1.730 ppm, este se desplazó 0.01 ppm (Figura 11C) alineándose incorrectamente. Cabe destacar que la intensidad de las señales modeladas por ASICS pareciera quedar en función del ajuste del multiplete de 1.730 ppm.

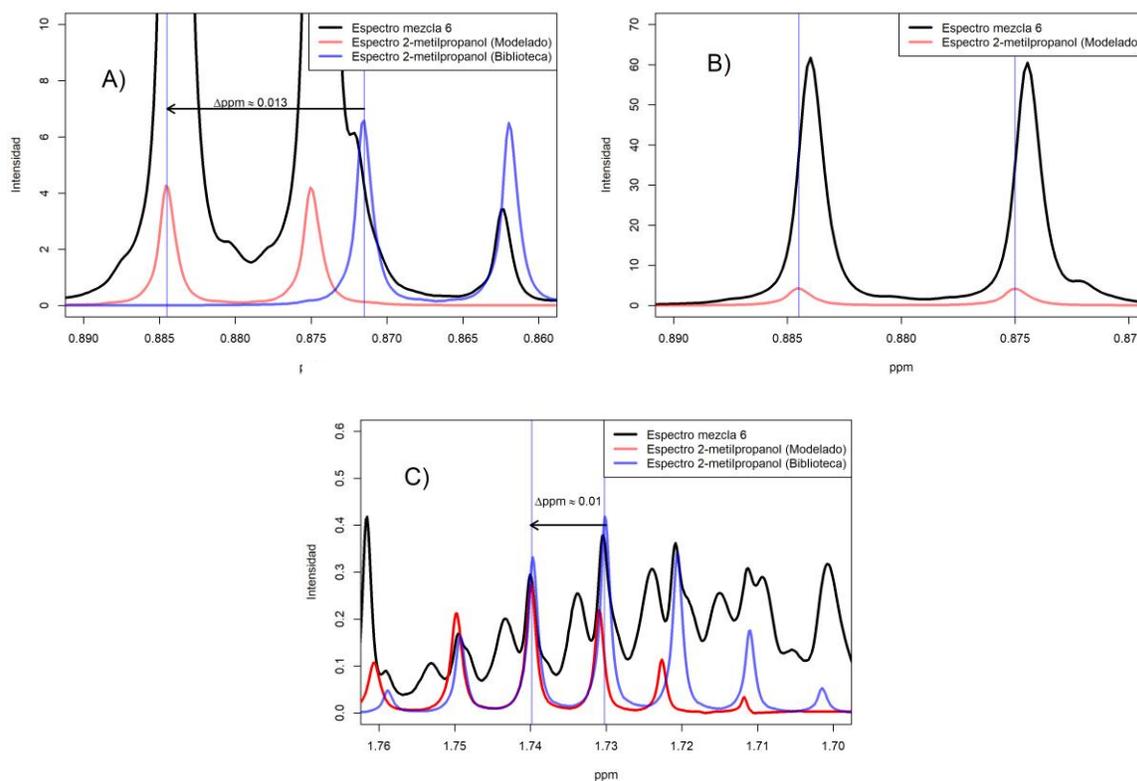


Figura 11. Expansión de los espectros de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de la mezcla 6 (negro) superpuesto con: A) y C) Espectro del 2-metilpropanol alineado (rojo) y de la biblioteca de ASICS (azul). B) Espectro del 2-metilpropanol alineado (rojo).

5.4.4.2 Error en el ajuste de intensidad y ancho de las señales

5.4.4.2.1 Ácido cítrico

El error en el ajuste de intensidad y ancho de las señales se presentó con el ácido cítrico en la mezcla 11 de compuestos con señales sin traslapar, en la Figura 12A se muestra su espectro en la región de 2.99-2.92 ppm donde se observa que el espectro modelado por ASICS del doblete de 2.97 ppm está alineado correctamente con la señal real, sin embargo, el ajuste en la intensidad no es el correcto. En la Figura 12B se muestra la región de 2.86-2.78 ppm del espectro de la misma mezcla, se observa que el espectro modelado no corresponde con el desplazamiento químico del doblete de 2.82 ppm, además, el ajuste del ancho de una señal es erróneo quedando muy delgada y sin ajustarse aparentemente con ninguna señal (Figura 12C), todo lo anterior genera una cuantificación incorrecta.

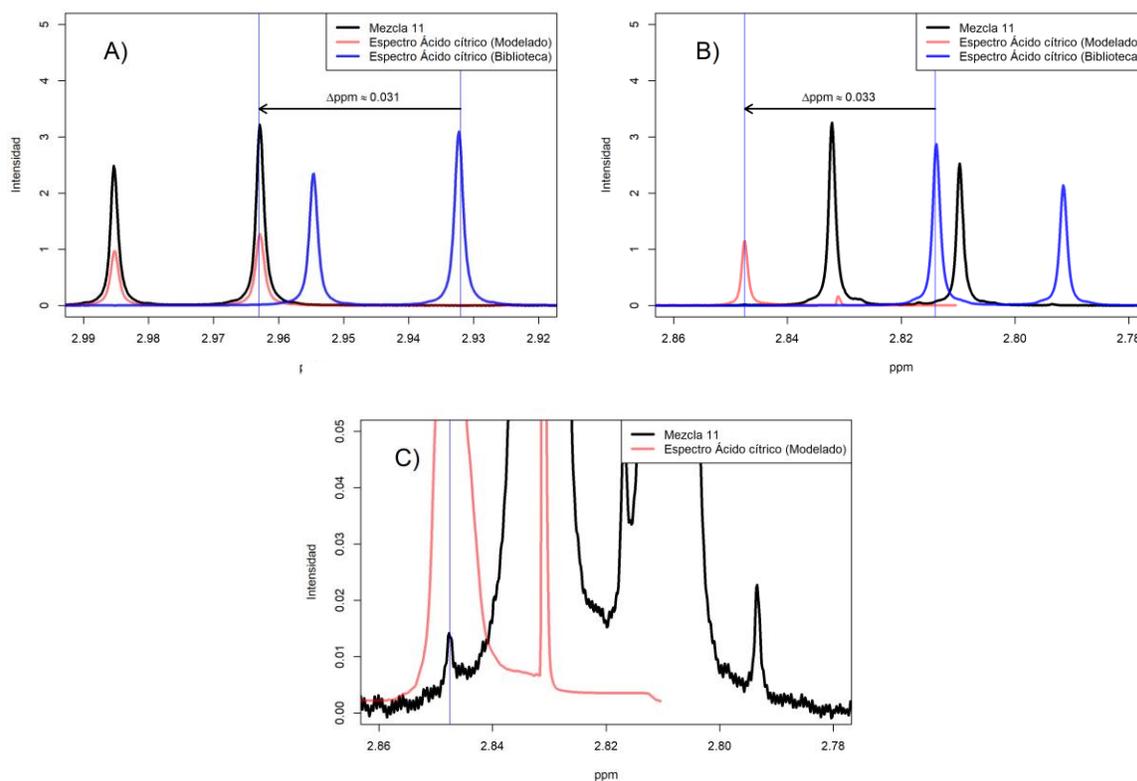


Figura 12. Expansión de los espectros de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/ H_2O : D_2O , 6:4) en la región del ácido cítrico de la mezcla 11 (negro) superpuesto con: Modelado de ASICS (rojo), biblioteca (azul). A) 2.99-2.92 ppm, B) 2.86-2.78 ppm y C) Misma región que B con diferente intensidad.

En la Figura 13A y B se muestran los espectros de la mezcla 8 usando un umbral de 0.01, en este caso el ajuste del desplazamiento químico del espectro modelado de ácido cítrico se aproxima al real, no obstante, la desviación en la alineación de las señales produce que la intensidad de estas no se ajuste adecuadamente. En la Figura 13C y D se observa que en el caso de la mezcla 1 con umbral de 0.005 el desplazamiento químico del espectro modelado coincide con el espectro real, sin embargo, el ajuste en intensidad y ancho del doblete de 2.81 ppm no es satisfactorio.

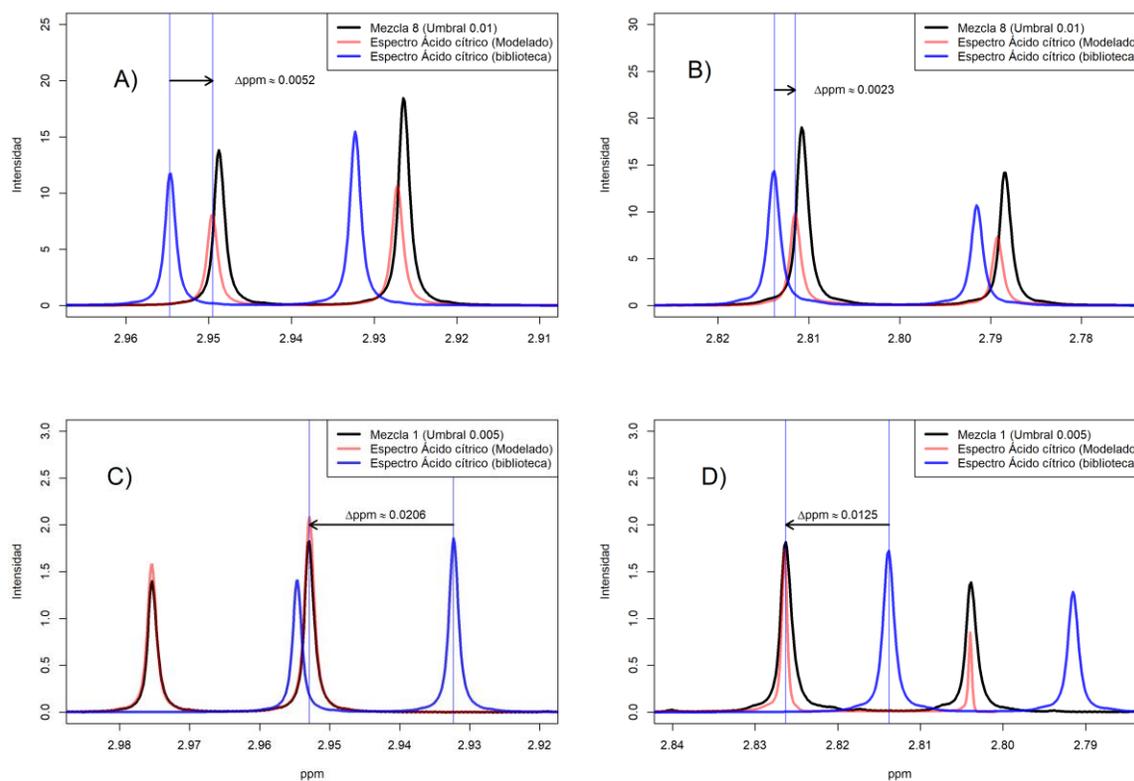


Figura 13. Expansión de los espectros de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) de la mezcla 8 en la región del ácido cítrico utilizando dos valores de umbral en las mezclas. A) y B) Umbral en mezclas de 0.01. C) y D) Umbral en mezclas de 0.005.

5.4.4.2.2 Metanol (señales sin traslapar)

La identificación del metanol se realizó correctamente en todas las mezclas pero; tal como se mencionó en la sección 4.2.6, los resultados de cuantificación no se realizaron debido a una contaminación en las disoluciones. En la Figura 14 se muestran los espectros de las mezclas 2 y 6 en la región del metanol, se logra ver que el desplazamiento químico de las señales modeladas coincide con las reales además de que el ajuste de su intensidad y ancho también se aproximan, no obstante, la diferencia en la intensidad de las señales genera un porcentaje de error en la cuantificación, que dependiendo de la exactitud buscada puede ser relevante.

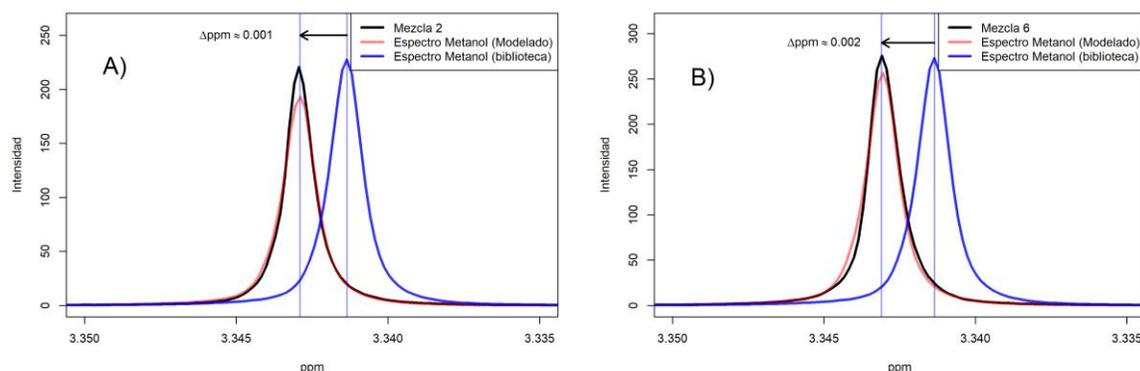


Figura 14. Expansión del espectro de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/ $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 6:4) en la región del metanol de: A) Mezcla 2 (negro), B) Mezcla 6 (negro). Ambos superpuestos con el espectro de metanol alineado (rojo) y de la biblioteca (azul).

5.4.4.3 Errores relacionados con los parámetros definidos en ASICS

5.4.4.3.1 Ácido fumárico

La cuantificación del ácido fumárico es un ejemplo de la importancia de los umbrales y del máximo desplazamiento químico permitido en el proceso de identificación. El ácido fumárico no fue cuantificado en las mezclas 1, 6, 11 y 13 (Tabla 18 Anexo III). En la Figura 15A se presenta el espectro de la biblioteca del ácido fumárico superpuesto con los espectros de dichas mezclas. La distancia entre la señal de la biblioteca y de la mezcla 1 es de 0.027 ppm, mientras que la distancia entre la señal de la biblioteca y de la mezcla 11 es de 0.040 ppm. Tal como se mencionó en la sección 4.4.3, ASICS solo es capaz de detectar las señales que estén dentro del intervalo $[d + M, d - M]$ (intervalo señalado en la Figura 15A), donde d es el desplazamiento químico del pico de la señal de la biblioteca y M es el máximo desplazamiento químico permitido (seleccionado por el usuario) definido como $M = 0.03 \text{ ppm}$. Por lo tanto, era de esperarse que la señal del ácido fumárico en la mezcla 11 no fuera identificada puesto que está fuera del intervalo $[6.735 + 0.03, 6.735 - 0.03]$, sin embargo, la señal de la mezcla 1 debió haber sido detectada ya que el pico de la señal se encuentra dentro del intervalo.

En la Figura 15A se señalan con flechas 6 señales satélites de ^{13}C del ácido fumárico de la biblioteca correspondientes a acoplamiento a dos enlaces ($J \approx 15 \text{ Hz}$), mientras que en la figura 15B se presenta el espectro completo de ácido fumárico donde se observan todas las señales satélites de ^{13}C , incluyendo las de un enlace de distancia ($J \approx 170 \text{ Hz}$). Estas

señales satélites de ^{13}C a un enlace de distancia fueron eliminadas en todas las señales de la biblioteca para facilitar el proceso de identificación.

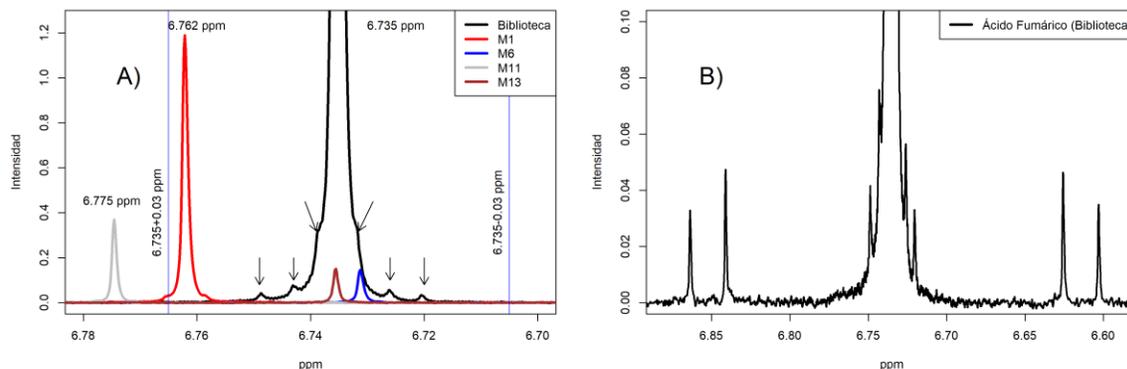


Figura 15. A) Espectros de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) superpuestos en la región del ácido fumárico de las mezclas 1 (rojo), 6 (azul), 11 (gris), 13 (café) y el espectro de ácido fumárico de la biblioteca (negro). B) Espectro de RMN- ^1H del ácido fumárico en donde se incluyen las señales satélites de ^{13}C .

En la Figura 16A se puede ver que los satélites de ^{13}C a dos enlaces del espectro de la biblioteca son detectadas por el algoritmo de ASICS dado que se encuentran por arriba del umbral de la biblioteca de 0.01 y, por lo tanto, son buscadas durante el proceso de identificación. Se presume que la causa de que el ácido fumárico no haya sido identificado en la mezcla 1 es que los satélites de ^{13}C se encuentran a nivel de ruido y por lo tanto no son observables (ver Figura 16B). Lo mismo ocurre con las mezclas 6 y 13 (Figura 16C), donde la concentración del ácido fumárico es aún menor (nivel 1 de concentración). Analizando estos resultados, se presume que al incrementar el valor del umbral de la biblioteca, únicamente para el espectro del ácido fumárico a un valor donde solo se detecte la señal principal, solucionaría este problema.

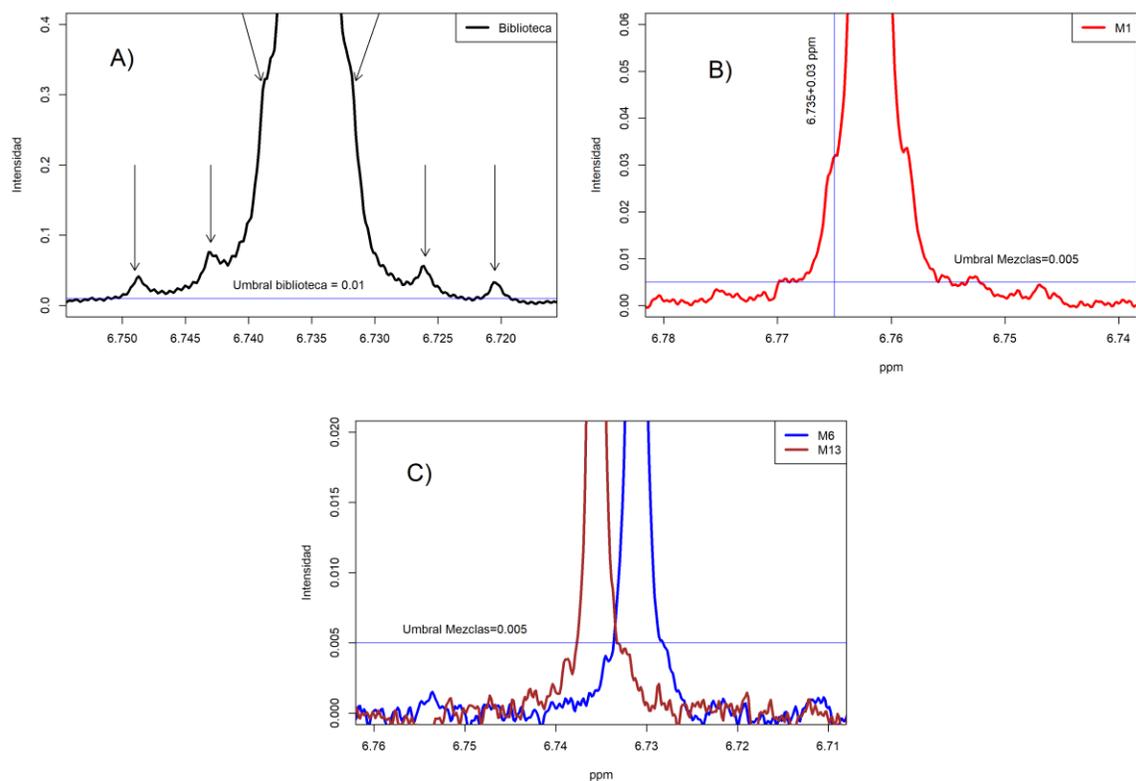


Figura 16. Expansión de los espectros de RMN^{-1}H (700MHz, 300K, EtOH/ $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 6:4) en la región del ácido fumárico de: A) Espectro de ácido fumárico de la biblioteca. B) Mezcla 1. C) Mezclas 6 y 13.

5.4.5 Sobreestimación y subestimación en la cuantificación de ASICS

Dentro de los compuestos que fueron subestimados en las mezclas con señales traslapadas se encuentra el ácido fórmico (Tabla 34, Anexo IV). En la Figura 17 se presenta el espectro de RMN^{-1}H de la mezcla 4 y 9 superpuesto con su correspondiente espectro modelado, se observa que la señal del ácido fórmico fue modelada con éxito en ambas mezclas, tanto en lo ancho como en la altura de la señal, no obstante, el error en la cuantificación en la mezcla 4 fue del -9.28% mientras que en la mezcla 9 fue de -31.03% . También se realizó la cuantificación con integrales, el error mediante este método fue del 5.00% para la mezcla 4 y de -20.60% para la mezcla 9. En el caso de la mezcla 9 se podría pensar en un problema relacionado con la concentración al preparar dicha disolución (o el estándar), no obstante, las cuantificaciones de ASICS subestimaron las cuantificaciones realizadas manualmente con integrales.

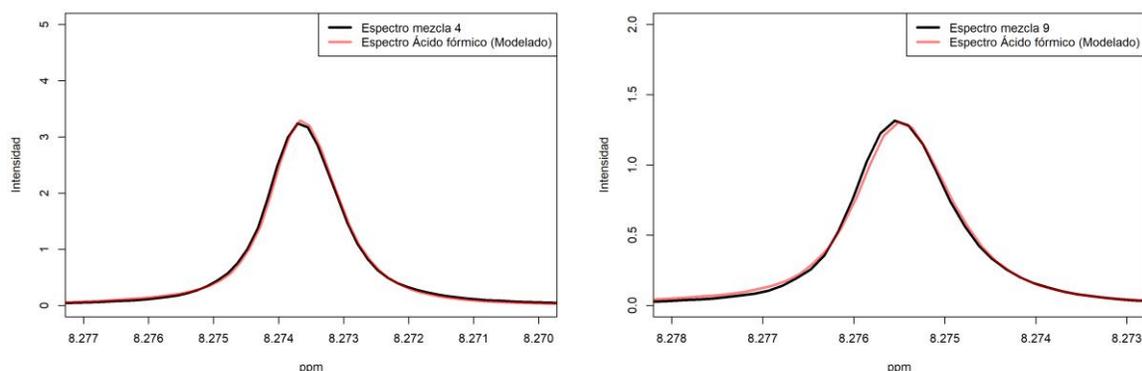


Figura 17. Expansión del espectro de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) en la región del ácido fórmico de las mezclas 4 y 9 superpuesto con su correspondiente espectro modelado por ASICS.

Un ejemplo de los compuestos que fueron sobreestimados fue el ácido gálico en las mezclas con señales traslapadas (Tabla 37 Anexo IV), en la Figura 18 se presenta el espectro de RMN- ^1H de la mezcla 1 y 5 superpuesto con su correspondiente espectro modelado. Se observa que la identificación fue correcta en ambos casos, sin embargo, el error en la mezcla 1 fue del 59.47%, mientras que en la mezcla 5 fue del 64.40%. Al realizar la cuantificación con integrales el error en la mezcla 1 fue de -0.57% y en la mezcla 5 de 1.63%. Se desconoce con certeza la causa de la sobreestimación de ASICS, no obstante, errores de este orden se presentaron en repetidas ocasiones dentro de los 37 compuestos estudiados.

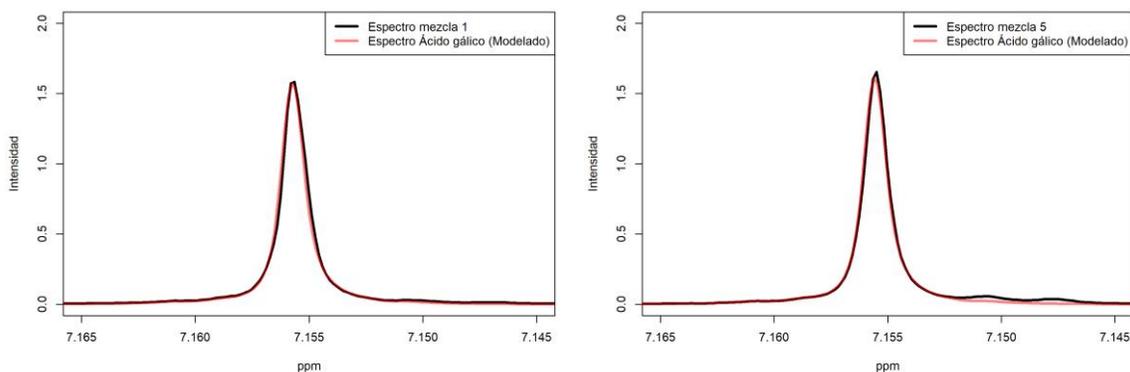


Figura 18. Expansión del espectro de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) en la región del ácido gálico en la mezcla 1 y 5 superpuesto con su correspondiente espectro alineado modelado por ASICS.

6. Discusión

En el presente estudio se demostró que ASICS es capaz de identificar y cuantificar los metabolitos del vino. Sin embargo, el éxito del algoritmo se ve notablemente disminuido con el incremento en la complejidad de las muestras, lo cual se demostró al comparar los resultados de la mezcla más sencilla de 12 metabolitos con las muestras de 38 metabolitos y la de los vinos. Respecto a la exactitud de las cuantificaciones, el intervalo de error fue muy amplio (Anexo III y Anexo IV) por lo que ASICS no es una herramienta útil en estudios que requieran de una gran exactitud, pero es de ayuda como herramienta de identificación y para obtener información acerca del orden de magnitud de la concentración de los metabolitos en la mayoría de los casos.

Una característica importante de ASICS es que el proceso de identificación y cuantificación se realiza en un periodo corto de tiempo (aproximadamente 1 min 30 s, considerando el número de muestras analizadas en la presente investigación). Cabe destacar que para el proceso de generación de gráficos se escribió un código reduciendo así los tiempos de análisis; sin embargo, la confirmación visual de los espectros modelados es un proceso lento que no puede ser omitido ya que es la única manera de examinar la calidad de los resultados de ASICS.

Con base en los resultados de la presente investigación, el uso de ASICS para el análisis de espectros es efectivo para la identificación y cuantificación de los metabolitos con señales más intensas ubicadas en regiones de bajo traslape. Sin embargo, en muestras de alta complejidad como las de vinos (alta densidad de señales) disminuye la probabilidad de identificar y cuantificar una señal correctamente y a su vez origina el aumento de falsos positivos durante la identificación.

Respecto al método de cuantificación manual con integrales utilizando el software MestreNova, la exactitud de las cuantificaciones calculadas son más exactas y confiables respecto a las calculadas con ASICS dado que el usuario selecciona las regiones a integrar y en el caso del método de desconvolución es posible ajustar el área de las señales modeladas, disminuyendo el error al mínimo; no obstante, el proceso es considerablemente más lento y puede tomar varias horas dependiendo del número de compuestos a cuantificar, de la complejidad de la muestra y de la experiencia del usuario. En cuanto al uso de MestreNova para la cuantificación de metabolitos en muestras de vino, el proceso es impráctico al analizar un gran número de muestras, debido a la

necesidad de ajustar las regiones de integración en cada espectro ya que el desplazamiento químico de las señales se puede modificar ligeramente de muestra a muestra debido a la variabilidad en la composición de los vinos. Otro factor por considerar es que el método de desconvolución de señales con multiplicidades complejas es arduo, lento y no siempre se modela con exactitud.

7. Conclusiones

En este trabajo se evaluó el funcionamiento de la paquetería de R ASICS que tiene como objetivo el identificar y cuantificar automáticamente los compuestos presentes en una muestra compleja mediante su espectro de RMN-¹H.

Las conclusiones puntuales del presente trabajo son:

- Las cuantificaciones de los metabolitos calculadas por ASICS presentan un mayor error respecto a las calculadas manualmente con integrales; sin embargo, el tiempo de análisis requerido por ASICS es mucho menor.
- La capacidad de identificación de los metabolitos con ASICS se ve reducida notablemente al incrementarse la complejidad de los espectros. Entre más señales traslapadas existan mayor será la probabilidad de obtener identificaciones y cuantificaciones erróneas.
- La identificación de los metabolitos que solo tengan un singulete en el espectro son susceptibles a identificarse erróneamente confundiéndose con señales de ruido o señales vecinas.
- La identificación de dos señales multipletes con constante de acoplamiento similar y desplazamiento químico cercano serán fácilmente confundidas por ASICS.
- La correcta optimización de los parámetros de ASICS, tales como los umbrales y el máximo desplazamiento químico permitido definirán la cantidad de compuestos identificados. Un umbral más cercano a las señales de ruido incrementará el número de falsos positivos en la identificación, mientras umbrales altos incrementa el número de falsos negativos.
- Aunque la limpieza de la biblioteca de ASICS se fundamenta en la premisa de que solo se identifican los compuestos en los espectros si se encuentran todas sus señales de la biblioteca, en el presente trabajo, se demostró que se pueden identificar metabolitos que no están presentes al confundir sus señales con otras.
- En general, utilizar un menor número de señales en los compuestos de la biblioteca, mejora la linealidad de las cuantificaciones de ASICS, pero disminuye la probabilidad de que sean identificados correctamente en mezclas complejas.

8. Perspectivas

En el presente trabajo se identificaron y expusieron algunas de las problemáticas a superar en el desarrollo de softwares dedicados a la identificación y cuantificación automática de metabolitos en los espectros de RMN-¹H, en especial en mezclas complejas como lo son las muestras de vinos. Se espera que los resultados obtenidos de la evaluación del software ASICS sean de gran valor para la mejora de softwares existentes así como en la creación de nuevos.

Anexo I. Diseño de mezclas de 12 compuestos.

Tabla 12. Alícuotas añadidas de disolución madre para preparar un mililitro de mezcla.

Compuesto	Conc. madre [mM]		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
1,3-propanodiol	647.50	Conc. [mM]	8.16	2.70	5.40	2.70	0.90	5.40	1.35	2.70	1.35	8.16	0.90	1.35	5.40	8.16	2.70
		Alícuota [μ L]	12.60	4.17	8.34	4.17	1.39	8.34	2.08	4.17	2.08	12.60	1.39	2.08	8.34	12.60	4.17
Acetaldehído	151.34	Conc. [mM]	0.27	2.39	2.39	1.60	1.60	0.40	0.40	0.27	0.80	2.39	0.27	0.80	1.60	0.27	2.39
		Alícuota [μ L]	1.76	15.80	15.80	10.60	10.60	2.64	2.64	1.76	5.29	15.80	1.76	5.29	10.60	1.76	15.80
Ácido acético	1796.03	Conc. [mM]	8.20	8.21	8.20	24.79	16.39	4.10	24.79	24.77	2.73	16.40	2.73	16.41	4.10	8.20	8.21
		Alícuota [μ L]	4.57	4.57	4.57	13.80	9.13	2.28	13.80	13.80	1.52	9.13	1.52	9.13	2.28	4.57	4.57
Ácido cítrico	433.59	Conc. [mM]	0.87	1.30	2.60	5.20	5.20	1.30	5.20	7.80	2.60	7.81	1.30	2.60	0.87	0.87	1.30
		Alícuota [μ L]	2.00	3.00	6.00	12.00	12.00	3.00	12.00	18.00	6.00	18.00	3.00	6.00	2.00	2.00	3.00
Ácido fórmico	343.43	Conc. [mM]	0.70	6.32	2.10	0.70	1.05	6.32	4.19	6.32	1.05	2.10	4.19	1.05	2.10	0.70	6.32
		Alícuota [μ L]	2.04	18.40	6.11	2.04	3.06	18.40	12.20	18.40	3.06	6.11	12.20	3.06	6.11	2.04	18.40
Ácido fumárico	11.31	Conc. [mM]	0.30	0.10	0.20	0.20	0.10	0.03	0.20	0.10	0.05	0.30	0.03	0.05	0.03	0.30	0.10
		Alícuota [μ L]	26.60	8.84	17.60	17.60	8.84	2.95	17.60	8.84	4.42	26.60	2.95	4.42	2.95	26.60	8.84
Ácido gálico	35.13	Conc. [mM]	0.10	0.15	0.10	0.60	0.90	0.90	0.15	0.10	0.30	0.60	0.60	0.15	0.90	0.10	0.15
		Alícuota [μ L]	2.85	4.27	2.85	17.00	25.6	25.6	4.27	2.85	8.54	17.00	17.00	4.27	25.60	2.85	4.27
Ácido pirúvico	77.48	Conc. [mM]	1.80	0.30	0.60	0.20	1.21	1.21	0.30	0.60	1.21	1.80	0.60	0.20	0.20	1.80	0.30
		Alícuota [μ L]	23.20	3.87	7.74	2.58	15.6	15.6	3.87	7.74	15.60	23.20	7.74	2.58	2.58	23.20	3.87
Ácido salicílico	10.28	Conc. [mM]	2.10	1.40	0.35	2.10	0.70	0.35	0.23	0.23	2.10	0.70	0.35	0.70	0.23	2.10	1.40
		Alícuota [μ L]	204.4	136.2	34.00	204.4	68.0	34.0	22.80	22.80	204.4	68.00	34.00	68.00	22.80	204.4	136.2
Ácido tartárico	802.59	Conc. [mM]	66.27	11.08	33.07	16.54	99.32	16.54	11.08	33.05	66.27	16.53	99.38	66.32	11.07	66.27	11.08
		Alícuota [μ L]	82.60	13.80	41.20	20.60	123.8	20.6	13.80	41.20	82.60	20.60	123.8	82.60	13.80	82.60	13.80
Alanina	182.67	Conc. [mM]	3.29	0.37	2.19	0.55	1.10	1.10	0.55	2.19	0.37	3.29	1.10	3.29	2.19	3.29	0.37
		Alícuota [μ L]	18.00	2.01	12.00	3.01	6.02	6.02	3.01	12.00	2.01	18.00	6.02	18.00	12.00	18.00	2.01
Metanol	1099.09	Conc. [mM]	18.90	3.16	6.30	2.10	12.52	18.91	6.30	3.15	2.10	3.15	12.53	18.91	12.52	18.90	3.16
		Alícuota [μ L]	17.20	2.87	5.73	1.91	11.40	17.20	5.73	2.87	1.91	2.87	11.40	17.20	11.40	17.20	2.87
Volumen alícuotas [μ L]			397.8	217.8	161.9	309.7	295.4	156.6	113.8	154.4	337.4	237.9	222.8	222.6	120.5	278.8	306.3
Volumen EtOH/H ₂ O al 12% [μ L]			202.6	382.0	438.0	290.0	305.0	443.0	486.0	446	263	362	377	377	480	321	294

Anexo II. Diseño de mezclas de 37 compuestos.

Tabla 13. Alícuotas añadidas de disolución madre para preparar un mililitro de cada mezcla.

Compuesto	Conc. madre [mM]		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
1,3-Propanodiol	449.75	Concentración. [mM]	1.35	2.70	2.70	5.40	5.40	1.35	5.40	2.70	1.35
		Alícuota [μ L]	3.00	6.00	6.00	12.00	12.00	3.00	12.00	6.00	3.00
2-Metilpropanol	251.64	Concentración. [mM]	2.62	1.30	1.30	2.62	0.65	0.65	0.65	1.30	2.62
		Alícuota [μ L]	10.40	5.17	5.17	10.40	2.58	2.58	2.58	5.17	10.40
3-Metilbutanol	220.48	Concentración. [mM]	2.25	4.50	8.99	2.25	8.99	9.00	2.25	4.50	4.50
		Alícuota [μ L]	10.20	20.40	40.80	10.20	40.80	40.80	10.20	20.40	20.40
Ácido Acético	1770.01	Concentración. [mM]	8.20	8.20	8.20	16.40	4.10	16.40	16.40	4.10	4.10
		Alícuota [μ L]	4.63	4.63	4.63	9.27	2.32	9.27	9.27	2.32	2.32
Acetoína	182.32	Concentración. [mM]	0.50	1.00	0.50	1.00	1.00	0.25	0.50	0.25	0.25
		Alícuota [μ L]	2.74	5.48	2.74	5.48	5.48	1.37	2.74	1.37	1.37
Alanina	190.48	Concentración. [mM]	1.10	0.55	2.21	1.10	0.55	0.55	1.10	2.21	2.21
		Alícuota [μ L]	5.77	2.89	11.60	5.77	2.89	2.89	5.77	11.60	11.60
Arabinosa	547.50	Concentración. [mM]	6.57	3.30	1.65	6.57	1.65	1.65	3.30	3.30	6.57
		Alícuota [μ L]	12.00	6.03	3.01	12.00	3.01	3.01	6.03	6.03	12.00
Arginina	487.24	Concentración. [mM]	5.85	5.85	2.90	5.85	1.45	1.45	2.90	1.45	2.90
		Alícuota [μ L]	12.00	12.00	5.95	12.00	2.98	2.98	5.95	2.98	5.95
Ácido benzoico	20.35	Concentración. [mM]	0.35	0.70	1.40	0.35	1.40	0.70	0.70	0.35	1.40
		Alícuota [μ L]	17.20	34.40	68.80	17.20	68.80	34.40	34.40	17.20	68.80
Cadaverina	35.28	Concentración. [mM]	0.05	0.05	0.10	0.10	0.05	0.10	0.20	0.20	0.20
		Alícuota [μ L]	1.42	1.42	2.83	2.83	1.42	2.83	5.67	5.67	5.67
Ácido caftárico	4.17	Concentración. [mM]	0.05	0.10	0.05	0.10	0.20	0.10	0.20	0.20	0.05
		Alícuota [μ L]	12.00	24.00	12.00	24.00	48.00	24.00	48.00	48.00	12.00
Ácido cítrico	584.95	Concentración. [mM]	2.60	5.20	2.60	1.30	5.20	1.30	2.60	1.30	5.20
		Alícuota [μ L]	4.44	8.89	4.44	2.22	8.89	2.22	4.44	2.22	8.89
Epicatequina	6.70	Concentración. [mM]	0.40	0.20	0.40	0.10	0.10	0.20	0.20	0.10	0.40
		Alícuota [μ L]	59.80	29.80	59.80	15.00	15.00	29.80	29.80	15.00	59.80
Acetato de etilo	379.87	Concentración. [mM]	1.15	2.30	4.63	4.63	1.15	4.63	1.15	2.30	2.30

Compuesto	Conc. madre [mM]		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
		Alícuota [μL]	3.03	6.05	12.20	12.20	3.03	12.20	3.03	6.05	6.05
Lactato de etilo	436.79	Concentración. [mM]	5.24	1.30	2.60	2.60	5.24	1.30	1.30	5.24	2.60
		Alícuota [μL]	12.00	2.98	5.95	5.95	12.00	2.98	2.98	12.00	5.95
Ácido fórmico	374.21	Concentración. [mM]	1.05	2.10	4.19	2.10	2.10	1.05	4.19	4.19	1.05
		Alícuota [μL]	2.81	5.61	11.20	5.61	5.61	2.81	11.20	11.20	2.81
Fructosa	953.95	Concentración. [mM]	2.81	11.25	5.60	11.25	5.60	11.26	2.80	2.80	5.60
		Alícuota [μL]	2.94	11.80	5.87	11.80	5.87	11.80	2.94	2.94	5.87
Acido fumárico	12.62	Concentración. [mM]	0.10	0.10	0.05	0.20	0.10	0.05	0.20	0.20	0.05
		Alícuota [μL]	7.92	7.92	3.96	15.80	7.92	3.96	15.80	15.80	3.96
Furfural	54.03	Concentración. [mM]	0.10	0.40	0.20	0.20	0.10	0.40	0.10	0.40	0.20
		Alícuota [μL]	1.85	7.40	3.70	3.70	1.85	7.40	1.85	7.40	3.70
GABA	334.63	Concentración. [mM]	1.00	2.00	2.00	1.00	4.01	1.00	4.01	2.00	4.01
		Alícuota [μL]	2.99	5.98	5.98	2.99	12.00	2.99	12.00	5.98	12.00
Ácido galacturónico	773.49	Concentración. [mM]	2.30	2.30	9.13	4.60	4.60	2.30	9.12	9.13	4.60
		Alícuota [μL]	2.97	2.97	11.80	5.95	5.95	2.97	11.80	11.80	5.95
Ácido gálico	36.89	Concentración. [mM]	0.30	0.60	0.15	0.60	0.30	0.15	0.30	0.60	0.15
		Alícuota [μL]	8.13	16.20	4.07	16.20	8.13	4.07	8.13	16.20	4.07
Ácido glucónico	435.86	Concentración. [mM]	2.50	1.25	2.50	1.25	4.97	4.97	1.25	2.50	4.97
		Alícuota [μL]	5.74	2.87	5.74	2.87	11.40	11.40	2.87	5.74	11.40
Glucosa	912.09	Concentración. [mM]	10.95	5.50	2.75	10.94	2.75	2.75	5.50	10.95	5.50
		Alícuota [μL]	12.00	6.03	3.02	12.00	3.02	3.02	6.03	12.00	6.03
HMF	24.24	Concentración. [mM]	0.20	0.05	0.05	0.20	0.20	0.10	0.10	0.10	0.05
		Alícuota [μL]	8.25	2.06	2.06	8.25	8.25	4.13	4.13	4.13	2.06
Ácido láctico	1888.96	Concentración. [mM]	22.67	5.65	5.65	11.30	5.65	11.30	22.66	11.30	22.66
		Alícuota [μL]	12.00	2.99	2.99	5.98	2.99	5.98	12.00	5.98	12.00
Ácido málico	1137.09	Concentración. [mM]	13.19	3.30	6.60	6.60	3.30	13.19	13.19	6.60	3.30
		Alícuota [μL]	11.60	2.90	5.80	5.80	2.90	11.60	11.60	5.80	2.90
Metanol	520.85	Concentración. [mM]	12.61	3.15	3.15	6.35	3.15	12.61	6.35	12.61	6.35
		Alícuota [μL]	24.20	6.05	6.05	12.20	6.05	24.20	12.20	24.20	12.20
Ácido pirúvico	266.87	Concentración. [mM]	0.60	0.60	1.20	1.20	0.30	0.30	0.30	0.60	1.20
		Alícuota [μL]	2.25	2.25	4.50	4.50	1.12	1.12	1.12	2.25	4.50

Compuesto	Conc. madre [mM]		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Prolina	1453.88	Concentración. [mM]	8.70	4.35	17.44	4.35	4.35	8.70	17.44	17.45	8.70
		Alícuota [μ L]	5.98	2.99	12.00	2.99	2.99	5.98	12.00	12.00	5.98
Ácido salicílico	19.38	Concentración. [mM]	1.40	0.70	0.35	0.35	0.35	1.40	0.70	1.40	0.70
		Alícuota [μ L]	72.20	36.20	18.00	18.00	18.00	72.20	36.20	72.20	36.20
Ácido shikímico	20.18	Concentración. [mM]	0.30	0.60	0.15	0.30	0.15	0.60	0.60	0.15	0.30
		Alícuota [μ L]	14.80	29.80	7.43	14.80	7.43	29.80	29.80	7.43	14.80
Ácido sórbico	10.97	Concentración. [mM]	0.40	1.60	0.80	1.60	1.60	0.40	0.80	0.40	0.80
		Alícuota [μ L]	36.40	146.00	73.00	146.00	146.00	36.40	73.00	36.40	73.00
Sacarosa	250.60	Concentración. [mM]	1.50	0.75	3.01	3.01	0.75	3.01	1.50	1.50	0.75
		Alícuota [μ L]	5.99	2.99	12.00	12.00	2.99	12.00	5.99	5.99	2.99
Ácido tartárico	803.29	Concentración. [mM]	33.11	33.09	16.54	8.35	8.35	33.10	16.55	8.35	16.54
		Alícuota [μ L]	41.20	41.20	20.60	10.40	10.40	41.20	20.60	10.40	20.60
Trigonelina	50.46	Concentración. [mM]	0.30	0.15	0.15	0.60	0.15	0.60	0.30	0.30	0.60
		Alícuota [μ L]	5.95	2.97	2.97	11.80	2.97	11.80	5.95	5.95	11.80
Putrescina	52.38	Concentración. [mM]	0.10	0.20	0.10	0.20	0.05	0.05	0.20	0.05	0.10
		Alícuota [μ L]	1.91	3.82	1.91	3.82	0.95	0.95	3.82	0.95	1.91
Volumen alícuotas [μ L]			460.71	519.15	470.59	490.00	504.00	482.11	483.88	444.73	490.94
Volumen EtOH/H ₂ O al 12% [μ L]			139.0	81.0	129.6	110.2	96.2	117.8	116.4	155.2	109.4

Anexo III. Cuantificaciones de mezclas con señales de RMN-¹H sin traslapar

Tabla 14. Cuantificación de 1,3-propanodiol con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

1,3-PROPANODIOL			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	8.16	407.37	6.56	-19.53	10.41	27.75
M2	3	2.70	132.93	2.14	-20.71	3.48	28.73
M3	4	5.40	276.85	4.46	-17.42	7.10	31.48
M4	3	2.70	144.84	2.33	-13.61	3.74	38.63
M5	1	0.90	49.62	0.80	-11.15	1.29	43.85
M6	4	5.40	276.8	4.46	-17.46	7.26	34.39
M7	2	1.35	74.58	1.20	-10.81	1.95	44.63
M8	3	2.70	162.03	2.61	-3.29	4.23	56.55
M9	2	1.35	75.57	1.22	-9.79	1.95	44.27
M10	5	8.16	405.72	6.54	-19.90	10.45	28.04
M11	1	0.90	49.45	0.80	-11.51	1.31	45.11
M12	2	1.35	78.71	1.27	-6.11	2.08	53.83
M13	4	5.40	279.46	4.50	-16.60	7.31	35.35
M14	5	8.16	403.84	6.51	-20.27	10.43	27.77
M15	1	0.90	50.63	0.82	-9.35	1.34	48.97
Estándar		2.50	167.72	Promedio	-13.83±5.30	Promedio	39.29±9.37

Tabla 15. Cuantificación de ácido acético con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO ACÉTICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	8.20	492.56	6.75	-17.69	8.51	3.84
M2	3	8.21	518.28	7.10	-13.53	9.00	9.60
M3	3	8.20	538.99	7.38	-9.98	8.51	3.77
M4	5	24.79	1490.72	20.42	-17.65	24.07	-2.93
M5	4	16.39	1071.65	14.68	-10.45	19.80	20.83
M6	2	4.10	263.15	3.60	-12.12	4.64	13.11
M7	5	24.79	1531.49	20.98	-15.39	24.81	0.08
M8	5	24.77	1713.26	23.47	-5.28	29.04	17.21
M9	1	2.73	182.79	2.50	-8.37	3.19	16.92
M10	4	16.40	1021.71	13.99	-14.67	16.83	2.62
M11	1	2.73	144.7	1.98	-27.51	2.39	-12.57
M12	4	16.41	1141.76	15.64	-4.68	20.63	25.75
M13	2	4.10	267.12	3.66	-10.73	4.56	11.36
M14	2	4.10	274.7	3.76	-8.25	4.57	11.50
M15	1	2.73	177.11	2.43	-11.22	2.96	8.48
Estándar		2.50	182.97	Promedio	-12.50±5.52	Promedio	8.64±9.52

Tabla 16. Cuantificación de ácido cítrico con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO CÍTRICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.87	96.49	0.80	-7.23	0.93	6.79
M2	2	1.30	146.01	1.22	-6.53	1.86	42.92
M3	3	2.60	290.63	2.42	-6.90	3.68	41.47
M4	4	5.20	507.74	4.23	-18.75	6.51	25.07
M5	4	5.20	562.55	4.69	-9.91	7.40	42.27
M6	2	1.30	137.57	1.15	-11.89	1.74	33.47
M7	4	5.20	526.76	4.39	-15.69	6.63	27.40
M8	5	7.80	921.63	7.68	-1.60	11.82	51.55
M9	3	2.60	266.27	2.22	-14.67	3.34	28.47
M10	5	7.81	788.26	6.57	-15.89	9.74	24.80
M11	2	1.30	152.47	1.27	-2.34	MI*	----
M12	3	2.60	304.99	2.54	-2.34	3.38	29.99
M13	1	0.87	94.7	0.79	-8.95	1.23	42.31
M14	1	0.87	95.4	0.79	-8.33	1.22	40.58
M15	5	7.80	861.99	7.18	-7.98	11.01	41.07
Estándar		2.50	301.72	Promedio	-9.27±5.07	Promedio	34.15±10.92

*MI: Mal identificado

Tabla 17. Cuantificación de ácido fórmico con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ACIDO FÓRMICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.70	9.78	0.61	-12.77	0.46	-34.79
M2	5	6.32	80.15	5.00	-20.86	4.15	-34.28
M3	3	2.10	28.46	1.78	-15.43	1.48	-29.76
M4	1	0.70	11.06	0.69	-1.51	0.51	-26.72
M5	2	1.05	15.91	0.99	-5.48	0.76	-27.41
M6	5	6.32	78.62	4.91	-22.38	4.07	-35.67
M7	4	4.19	53.01	3.31	-21.06	2.69	-35.85
M8	5	6.32	89.21	5.57	-11.86	4.65	-26.31
M9	2	1.05	14.67	0.92	-12.77	0.81	-23.13
M10	3	2.10	27.98	1.75	-16.79	1.48	-29.36
M11	4	4.19	55.39	3.46	-17.52	2.86	-31.69
M12	2	1.05	17.73	1.11	5.34	0.89	-15.36
M13	3	2.10	26.95	1.68	-19.87	1.45	-31.04
M14	4	4.19	52.69	3.29	-21.53	2.70	-35.58
M15	1	0.70	9.94	0.62	-11.35	0.57	-18.18
Estándar		2.50	39.34	Promedio	-13.72±7.73	Promedio	-29.01±6.11

Tabla 18. Cuantificación de ácido fumárico con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO FUMÁRICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	0.30	12.88	0.24	-19.77	NI**	-----
M2	3	0.10	4.51	0.08	-15.52	0.11	7.17
M3	4	0.20	7.8	0.15	-26.61	0.22	8.92
M4	4	0.20	7.94	0.15	-25.31	0.21	4.98
M5	3	0.10	5.63	0.11	5.52	0.15	53.67
M6	1	0.03	1.54	0.03	-13.58	NI**	-----
M7	4	0.20	7.52	0.14	-29.25	0.20	1.45
M8	3	0.10	5.07	0.09	-4.97	0.14	35.28
M9	2	0.05	3.68	0.07	37.92	0.08	55.14
M10	5	0.30	11.82	0.22	-26.41	0.32	7.10
M11	1	0.03	3.68	0.07	106.55	NI**	-----
M12	2	0.05	3.5	0.07	31.07	0.07	40.39
M13	1	0.03	1.25	0.02	-29.73	NI**	-----
M14	5	0.30	12.12	0.23	-24.55	0.32	6.81
M15	2	0.05	4.07	0.08	52.52	0.11	120.64
Estándar		2.50	133.03	Promedio	-6.33±26.54	Promedio	31.05±34.38

** NI: No Identificado

Tabla 19. Cuantificación de ácido gálico con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO GÁLICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.10	5.71	0.09	-8.13	0.14	36.57
M2	2	0.15	7.91	0.13	-15.21	0.21	40.36
M3	1	0.10	5.27	0.08	-15.25	0.14	42.86
M4	4	0.60	29.82	0.48	-19.72	0.78	30.83
M5	5	0.90	47.48	0.76	-15.05	1.28	42.39
M6	5	0.90	44.89	0.72	-19.75	1.19	31.82
M7	2	0.15	8.34	0.13	-10.60	0.21	41.15
M8	1	0.10	5.55	0.09	-10.81	0.15	53.31
M9	3	0.30	15.76	0.25	-15.47	0.42	39.54
M10	4	0.60	28.52	0.46	-23.20	0.78	30.82
M11	4	0.60	31.57	0.51	-15.00	0.82	37.84
M12	2	0.15	8.54	0.14	-8.47	0.23	54.10
M13	5	0.90	44.90	0.72	-19.67	1.19	32.67
M14	3	0.30	14.73	0.24	-21.05	0.41	36.25
M15	3	0.30	16.40	0.26	-12.05	0.43	43.83
Estándar		2.50	155.44	Promedio	-15.29±4.51	Promedio	39.62±6.95

Tabla 20. Cuantificación de ácido pirúvico con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO PIRÚVICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	1.80	59.834	1.36	-24.49	1.04	-42.16
M2	2	0.30	11.801	0.27	-10.78	0.20	-31.68
M3	3	0.60	23.682	0.54	-10.51	0.42	-30.48
M4	1	0.20	8.886	0.20	0.77	0.16	-20.06
M5	4	1.21	45.383	1.03	-14.83	0.78	-35.33
M6	4	1.21	46.267	1.05	-13.24	0.80	-33.63
M7	2	0.30	11.67	0.26	-11.77	0.21	-30.06
M8	3	0.60	27.443	0.62	3.81	0.49	-18.55
M9	4	1.21	47.376	1.07	-11.09	0.82	-31.92
M10	5	1.80	66.912	1.52	-15.60	1.14	-36.61
M11	3	0.60	20.342	0.46	-23.10	0.36	-39.95
M12	1	0.20	8.953	0.20	1.46	0.15	-24.19
M13	1	0.20	8.104	0.18	-8.03	0.15	-27.25
M14	5	1.80	70.825	1.61	-10.67	1.20	-33.31
M15	2	0.30	11.189	0.25	-15.40	0.20	-33.14
Estándar		2.50	110.26	Promedio	-10.90±7.79	Promedio	-31.22±6.37

Tabla 21. Cuantificación de ácido salicílico con MestreNova y ASICS, utilizando las señales de 6.97, 7.49, 7.85 ppm. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO SALICÍLICO			Área				MestreNova		ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	[7.96-7.76] ppm	[7.60-7.41] ppm	[7.07-6.90] ppm	SUMA	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	2.10	44.24	45.16	87.20	176.60	1.32	-37.24	1.94	-7.48
M2	4	1.40	29.05	29.95	58.59	117.59	0.88	-37.32	1.44	2.62
M3	2	0.35	6.93	8.14	14.06	29.13	0.22	-37.79	0.37	6.30
M4	5	2.10	45.07	45.47	89.68	180.22	1.35	-35.99	2.29	8.83
M5	3	0.70	15.81	15.62	28.68	60.11	0.45	-35.78	0.76	8.18
M6	2	0.35	6.87	8.25	14.57	29.69	0.22	-36.61	0.38	9.25
M7	1	0.23	5.55	5.98	9.25	20.78	0.16	-33.83	0.26	10.72
M8	1	0.23	6.21	6.29	11.53	24.03	0.18	-23.44	0.29	24.10
M9	5	2.10	46.70	47.63	90.96	185.29	1.38	-34.15	2.30	9.74
M10	3	0.70	14.77	14.47	30.50	59.74	0.45	-36.21	0.77	10.07
M11	2	0.35	7.89	7.12	14.80	29.81	0.22	-36.35	0.25	-28.27
M12	3	0.70	16.29	15.94	31.97	64.20	0.48	-31.47	0.82	17.75
M13	1	0.23	4.77	4.94	9.28	18.99	0.14	-39.49	0.24	3.87
M14	4	1.40	30.68	29.78	57.85	118.31	0.88	-36.93	1.51	7.54
M15	4	1.40	31.00	29.55	58.24	118.79	0.89	-36.65	1.48	6.04
Estándar		2.50	83.06	84.65	167.25	334.96	Promedio	-35.28±3.65	Promedio	5.95±11.30

Tabla 22. Cuantificación de ácido salicílico con MestreNova y ASICS, utilizando la señal de 7.85 ppm. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO SALICÍLICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	2.10	44.24	1.33	-36.59	2.29	9.20
M2	4	1.40	29.05	0.87	-37.55	1.55	10.89
M3	2	0.35	6.93	0.21	-40.32	0.38	7.59
M4	5	2.10	45.07	1.36	-35.45	2.36	12.34
M5	3	0.70	15.81	0.48	-31.89	0.83	19.46
M6	2	0.35	6.87	0.21	-40.85	0.39	11.50
M7	1	0.23	5.55	0.17	-28.73	0.27	14.87
M8	1	0.23	6.21	0.19	-20.21	0.29	25.44
M9	5	2.10	46.70	1.41	-33.07	2.38	13.35
M10	3	0.70	14.77	0.44	-36.40	0.77	9.83
M11	2	0.35	7.89	0.24	-32.06	0.41	17.28
M12	3	0.70	16.29	0.49	-29.88	0.90	28.05
M13	1	0.23	4.77	0.14	-38.71	0.26	10.59
M14	4	1.40	30.68	0.92	-34.05	1.57	11.99
M15	4	1.40	31.00	0.93	-33.33	1.60	14.39
Estándar		2.50	83.06	Promedio	-33.94±5.04	Promedio	14.45±5.67

Tabla 23. Cuantificación de ácido tartárico con MestreNova y ASICS. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ÁCIDO TARTÁRICO			MestreNova			ASICS	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	4	66.27	1273	22.78	-65.63	18.16	-72.60
M2	1	11.08	262.03	4.69	-57.68	6.60	-40.46
M3	3	33.07	718.63	12.86	-61.12	17.76	-46.30
M4	2	16.54	522.99	9.36	-43.42	13.16	-20.40
M5	5	99.32	1800.01	32.21	-67.57	46.10	-53.59
M6	2	16.54	726.85	13.00	-21.37	18.72	13.16
M7	1	11.08	518.31	9.27	-16.29	13.09	18.19
M8	3	33.05	1878.74	33.61	1.70	48.23	45.93
M9	4	66.27	1862.58	33.32	-49.71	58.13	-12.28
M10	2	16.53	835.31	14.95	-9.62	20.80	25.80
M11	5	99.38	2211.11	39.56	-60.19	MI*	-----
M12	4	66.32	2335.49	41.79	-36.99	52.23	-21.24
M13	1	11.07	526.85	9.43	-14.85	13.24	19.63
M14	3	33.07	1497.58	26.79	-18.98	37.79	14.28
M15	5	99.33	1711.02	30.61	-69.18	42.48	-57.23
Estándar		2.50	139.73	Promedio	-39.39±23.37	Promedio	-13.37±35.44

*MI: Mal Identificado

Tabla 24. Cuantificación de alanina con MestreNova y ASICS utilizando las señales de 1.48, 3.83 ppm. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ALANINA			Área			MestreNova (Integrales)		ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	[3.92-3.80]	[1.53-1.45]	SUMA	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	3.29	71.44	267.057	338.50	3.02	-8.08	3.73	13.44
M2	1	0.37	8.09	30.80	38.89	0.35	-5.48	0.48	30.47
M3	4	2.19	47.84	177.117	224.957	2.01	-8.41	2.86	30.24
M4	2	0.55	12.90	48.521	61.421	0.55	-0.32	0.78	41.63
M5	3	1.10	26.91	98.515	125.425	1.12	1.85	1.56	42.07
M6	3	1.10	24.72	94.749	119.469	1.07	-3.07	NI**	
M7	2	0.55	12.11	46.547	58.657	0.52	-4.80	NI**	
M8	4	2.19	55.73	197.081	252.811	2.26	2.98	3.20	45.97
M9	1	0.37	7.92	35.254	43.174	0.39	5.00	0.53	44.87
M10	5	3.29	73.00	264.782	337.782	3.01	-8.32	4.10	24.68
M11	3	1.10	29.92	82.343	112.263	1.00	-8.90	NI**	
M12	5	3.29	79.15	293.849	372.999	3.33	1.21	4.78	45.23
M13	4	2.19	47.46	174.556	222.016	1.98	-9.56	2.83	29.04
M14	2	0.55	13.03	50.478	63.508	0.57	3.08	0.79	43.48
M15	1	0.37	7.55	32.851	40.401	0.36	-1.75	0.53	43.32
Estándar		2.50	59.86	220.24	280.10	Promedio	-2.97±4.88	Promedio	36.20±9.96

**NI: No Identificado

Tabla 25. Cuantificación de alanina con MestreNova y ASICS, utilizando la señal 1.48 ppm. Error relativo a la concentración gravimétrica.

ALANINA			MestreNova (Integrales)			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Área	Cuantificación [mM]	Error [%]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	5	3.29	267.057	3.03	-7.77	4.47	36.03
M2	1	0.37	30.8	0.35	-4.80	0.51	39.60
M3	4	2.19	177.117	2.01	-8.29	2.99	36.30
M4	2	0.55	48.521	0.55	0.14	0.82	48.68
M5	3	1.10	98.515	1.12	1.74	1.67	51.85
M6	3	1.10	94.749	1.08	-2.23	1.59	44.22
M7	2	0.55	46.547	0.53	-3.92	0.79	44.15
M8	4	2.19	197.081	2.24	2.10	3.36	53.29
M9	1	0.37	35.254	0.40	9.04	0.56	53.22
M10	5	3.29	264.782	3.01	-8.60	4.46	35.77
M11	3	1.10	82.343	0.93	-15.02	1.39	26.28
M12	5	3.29	293.849	3.34	1.41	5.08	54.31
M13	4	2.19	174.556	1.98	-9.56	2.97	35.54
M14	2	0.55	50.478	0.57	4.20	0.83	51.58
M15	1	0.37	32.851	0.37	1.60	0.55	51.01
Estándar		2.50	220.24	Promedio	-2.66±6.15	Promedio	44.12±8.42

Anexo IV. Cuantificaciones de mezclas con señales de RMN-¹H traslapadas

Tabla 26. Cuantificación de 1,3-propanodiol con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

1,3-PROPANODIOL			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	1.35	2.26	67.36
M2	2	2.70	4.47	65.67
M3	2	2.70	4.46	65.25
M4	3	5.40	8.45	56.63
M5	3	5.40	8.54	58.36
M6	1	1.35	2.21	63.92
M7	3	5.40	8.26	53.15
M8	2	2.70	4.40	62.97
M9	1	1.35	2.26	67.47

Tabla 27. Cuantificación de 2-metilpropanol con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica.

2-METILPROPANOL			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	2.62	3.30	26.03
M2	2	1.30	MAL IDENTIFICADO	-----
M3	2	1.30	MAL IDENTIFICADO	-----
M4	3	2.62	MAL IDENTIFICADO	-----
M5	1	0.65	MAL IDENTIFICADO	-----
M6	1	0.65	MAL IDENTIFICADO	-----
M7	1	0.65	NO IDENTIFICADO	-----
M8	2	1.30	MAL IDENTIFICADO	-----
M9	3	2.62	MAL IDENTIFICADO	-----

Tabla 28. Cuantificación de 3-metilbutanol con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

3-METILBUTANOL			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	2.25	3.12	38.89
M2	2	4.50	6.30	40.19
M3	3	8.99	11.25	25.05
M4	1	2.25	3.53	56.91
M5	3	8.99	10.29	14.43
M6	3	9.00	11.63	29.22
M7	1	2.25	3.04	35.04
M8	2	4.50	6.56	45.79
M9	2	4.50	6.20	37.83

Tabla 29. Cuantificación de acetato de etilo con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ACETATO DE ETILO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	1.15	MAL IDENTIFICADO	-----
M2	2	2.30	MAL IDENTIFICADO	-----
M3	3	4.63	4.03	-13.02
M4	3	4.63	3.80	-18.07
M5	1	1.15	MAL IDENTIFICADO	-----
M6	3	4.63	3.16	-31.75
M7	1	1.15	MAL IDENTIFICADO	-----
M8	2	2.30	MAL IDENTIFICADO	-----
M9	2	2.30	1.85	-19.65

Tabla 30. Cuantificación de acetoina con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ACETOÍNA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.50	0.74	47.10
M2	3	1.00	1.43	42.87
M3	2	0.50	0.68	36.11
M4	3	1.00	1.35	34.66
M5	3	1.00	1.47	46.77
M6	1	0.25	0.36	43.74
M7	2	0.50	0.77	54.39
M8	1	0.25	0.38	50.92
M9	1	0.25	0.37	49.71

Tabla 31. Cuantificación de ácido acético con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración

ÁCIDO ACÉTICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	8.20	8.54	4.21
M2	2	8.20	9.41	14.82
M3	2	8.20	11.00	34.21
M4	3	16.40	21.85	33.29
M5	1	4.10	4.11	0.34
M6	3	16.40	21.64	31.95
M7	3	16.40	17.25	5.22
M8	1	4.10	NO IDENTIFICADO	-----
M9	1	4.10	5.26	28.33

Tabla 32. Cuantificación de ácido benzoico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO BENZOICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.35	0.47	35.03
M2	2	0.70	0.91	30.17
M3	3	1.40	1.74	24.59
M4	1	0.35	0.50	41.66
M5	3	1.40	1.83	30.79
M6	2	0.70	0.89	27.82
M7	2	0.70	0.90	28.73
M8	1	0.35	0.48	36.04
M9	3	1.40	1.79	27.62

Tabla 33. Cuantificación de ácido cítrico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO CÍTRICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	2.60	4.37	68.08
M2	3	5.20	8.44	62.28
M3	2	2.60	3.75	44.31
M4	1	1.30	1.88	44.56
M5	3	5.20	9.17	76.41
M6	1	1.30	2.45	88.13
M7	2	2.60	4.73	82.08
M8	1	1.30	2.13	64.04
M9	3	5.20	8.38	61.28

Tabla 34. Cuantificación de ácido fórmico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO FÓRMICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	1.05	0.89	-15.00
M2	2	2.10	1.76	-16.37
M3	3	4.19	3.30	-21.27
M4	2	2.10	1.90	-9.28
M5	2	2.10	1.69	-19.40
M6	1	1.05	0.92	-12.15
M7	3	4.19	3.41	-18.70
M8	3	4.19	3.36	-19.85
M9	1	1.05	0.72	-31.03

Tabla 35. Cuantificación de ácido fumárico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO FUMÁRICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.10	0.17	73.18
M2	2	0.10	0.17	73.27
M3	1	0.05	0.09	80.96
M4	3	0.20	0.28	38.03
M5	2	0.10	0.13	25.74
M6	1	0.05	0.09	77.85
M7	3	0.20	0.27	33.04
M8	3	0.20	0.25	23.63
M9	1	0.05	0.09	80.35

Tabla 36. Cuantificación de ácido galacturónico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO GALACTURÓNICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	2.30	3.84	67.22
M2	1	2.30	3.64	58.19
M3	3	9.13	9.08	-0.52
M4	2	4.60	5.92	28.67
M5	2	4.60	4.93	7.20
M6	1	2.30	3.44	49.74
M7	3	9.12	9.59	5.07
M8	3	9.13	10.21	11.87
M9	2	4.60	5.64	22.64

Tabla 37. Cuantificación de ácido gálico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO GÁLICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.30	0.48	59.47
M2	3	0.60	0.96	60.88
M3	1	0.15	0.25	63.38
M4	3	0.60	0.97	62.49
M5	2	0.30	0.49	64.40
M6	1	0.15	0.26	70.25
M7	2	0.30	0.49	62.37
M8	3	0.60	0.96	60.48
M9	1	0.15	0.24	58.86

Tabla 38. Cuantificación de ácido glucónico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO GLUCÓNICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	2.50	3.01	20.33
M2	1	1.25	MAL IDENTIFICADO	-----
M3	2	2.50	3.02	20.81
M4	1	1.25	1.03	-17.41
M5	3	4.97	6.46	29.96
M6	3	4.97	6.14	23.58
M7	1	1.25	MAL IDENTIFICADO	-----
M8	2	2.50	3.09	23.70
M9	3	4.97	5.88	18.40

Tabla 39. Cuantificación de ácido láctico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO LÁCTICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	22.67	17.94	-20.89
M2	1	5.65	4.11	-27.27
M3	1	5.65	5.35	-5.24
M4	2	11.30	10.88	-3.68
M5	1	5.65	5.47	-3.16
M6	2	11.30	8.24	-27.12
M7	3	22.66	18.65	-17.72
M8	2	11.30	10.37	-8.21
M9	3	22.66	17.51	-22.75

Tabla 40. Cuantificación de ácido málico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO MÁLICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	13.19	18.38	39.33
M2	1	3.30	5.59	69.39
M3	2	6.60	9.92	50.35
M4	2	6.60	10.75	62.97
M5	1	3.30	5.23	58.55
M6	3	13.19	19.54	48.10
M7	3	13.19	18.50	40.30
M8	2	6.60	10.10	52.99
M9	1	3.30	5.73	73.57

Tabla 41. Cuantificación de ácido pirúvico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO PIRÚVICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.60	0.48	-19.49
M2	2	0.60	0.47	-22.31
M3	3	1.20	0.89	-26.15
M4	3	1.20	0.93	-22.80
M5	1	0.30	0.23	-22.33
M6	1	0.30	NO IDENTIFICADO	----
M7	1	0.30	NO IDENTIFICADO	----
M8	2	0.60	NO IDENTIFICADO	----
M9	3	1.20	0.93	-22.71

Tabla 42. Cuantificación de ácido salicílico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO SALICÍLICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	1.40	1.82	29.81
M2	2	0.70	0.90	27.77
M3	1	0.35	0.43	22.23
M4	1	0.35	0.43	24.28
M5	1	0.35	0.44	25.30
M6	3	1.40	1.81	28.99
M7	2	0.70	0.91	29.39
M8	3	1.40	1.80	28.71
M9	2	0.70	0.89	27.02

Tabla 43. Cuantificación de ácido shikímico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO SHIKIMICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.30	0.64	114.05
M2	3	0.60	1.13	87.77
M3	1	0.15	0.33	120.90
M4	2	0.30	0.67	123.16
M5	1	0.15	0.29	94.43
M6	3	0.60	1.00	66.85
M7	3	0.60	1.04	72.18
M8	1	0.15	0.27	81.50
M9	2	0.30	0.56	88.30

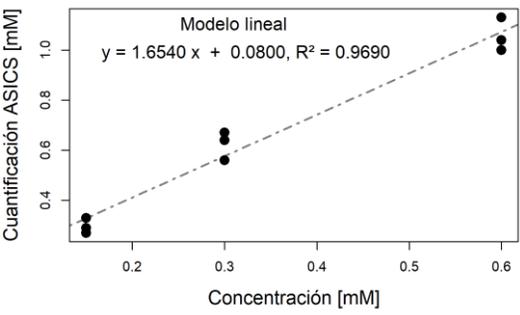


Tabla 44. Cuantificación de ácido sórbico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO SÓRBICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.40	0.61	53.54
M2	3	1.60	2.56	59.65
M3	2	0.80	1.20	49.82
M4	3	1.60	2.56	60.08
M5	3	1.60	2.53	58.09
M6	1	0.40	0.61	52.78
M7	2	0.80	1.23	53.37
M8	1	0.40	0.60	50.52
M9	2	0.80	1.22	52.42

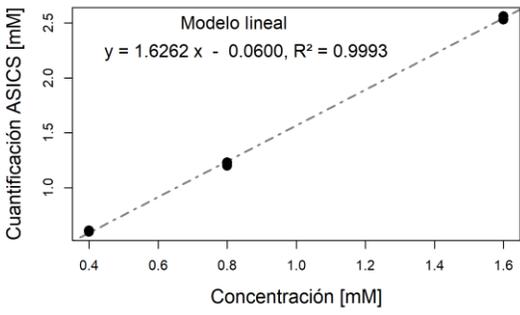


Tabla 45. Cuantificación de ácido tartárico con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ÁCIDO TARTÁRICO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	33.11	30.54	-7.74
M2	3	33.09	21.35	-35.48
M3	2	16.54	22.46	35.78
M4	1	8.35	10.16	21.61
M5	1	8.35	11.31	35.43
M6	3	33.10	23.95	-27.65
M7	2	16.55	21.50	29.94
M8	1	8.35	9.19	10.05
M9	2	16.54	9.12	-44.87

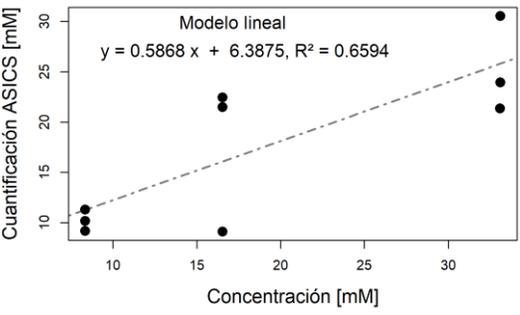


Tabla 46. Cuantificación de alanina con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración

ALANINA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	1.10	MAL IDENTIFICADO	-----
M2	1	0.55	0.95	72.79
M3	3	2.21	2.96	34.03
M4	2	1.10	MAL IDENTIFICADO	-----
M5	1	0.55	1.08	95.85
M6	1	0.55	MAL IDENTIFICADO	-----
M7	2	1.10	MAL IDENTIFICADO	-----
M8	3	2.21	2.80	26.85
M9	3	2.21	MAL IDENTIFICADO	-----

Tabla 47. Cuantificación de arabinosa con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ARABINOSA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	6.57	11.13	69.39
M2	2	3.30	6.14	86.06
M3	1	1.65	MAL IDENTIFICADO	-----
M4	3	6.57	11.07	68.55
M5	1	1.65	2.97	80.28
M6	1	1.65	MAL IDENTIFICADO	-----
M7	2	3.30	5.63	70.60
M8	2	3.30	6.72	103.74
M9	3	6.57	10.61	61.52

Tabla 48. Cuantificación de arginina con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

ARGININA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	5.85	7.91	35.19
M2	3	5.85	7.35	25.66
M3	2	2.90	4.36	50.30
M4	3	5.85	8.09	38.38
M5	1	1.45	2.46	69.40
M6	1	1.45	2.38	64.28
M7	2	2.90	3.86	33.05
M8	1	1.45	2.65	82.57
M9	2	2.90	4.41	52.25

Tabla 49. Cuantificación de cadaverina con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica.

CADAVERINA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.05	MAL IDENTIFICADA	-----
M2	1	0.05	MAL IDENTIFICADA	-----
M3	2	0.10	MAL IDENTIFICADA	-----
M4	2	0.10	MAL IDENTIFICADA	-----
M5	1	0.05	MAL IDENTIFICADA	-----
M6	2	0.10	MAL IDENTIFICADA	-----
M7	3	0.20	MAL IDENTIFICADA	-----
M8	3	0.20	MAL IDENTIFICADA	-----
M9	3	0.20	MAL IDENTIFICADA	-----

Tabla 50. Cuantificación de epicatequina con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

EPICATEQUINA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	0.40	0.68	69.02
M2	2	0.20	0.35	75.07
M3	3	0.40	0.66	65.72
M4	1	0.10	0.18	83.12
M5	1	0.10	0.17	73.02
M6	2	0.20	0.33	66.20
M7	2	0.20	0.33	67.60
M8	1	0.10	MAL IDENTIFICADO	-----
M9	3	0.40	0.66	64.82

Tabla 51. Cuantificación de fructosa con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

FRUCTOSA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	2.81	9.21	228.35
M2	3	11.25	21.38	89.99
M3	2	5.60	12.46	122.50
M4	3	11.25	25.02	122.31
M5	2	5.60	12.54	124.03
M6	3	11.26	21.02	86.75
M7	1	2.80	7.90	182.23
M8	1	2.80	8.08	188.49
M9	2	5.60	13.76	145.84

Tabla 52. Cuantificación de furfural con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

FURFURAL			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	0.10	NO IDENTIFICADO	-----
M2	3	0.40	0.32	-19.23
M3	2	0.20	0.15	-23.11
M4	2	0.20	0.17	-14.35
M5	1	0.10	NO IDENTIFICADO	-----
M6	3	0.40	0.33	-16.48
M7	1	0.10	NO IDENTIFICADO	-----
M8	3	0.40	0.32	-18.81
M9	2	0.20	NO IDENTIFICADO	-----

Tabla 53. Cuantificación de GABA con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

GABA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	1	1.00	1.67	66.72
M2	2	2.00	3.24	61.92
M3	2	2.00	3.26	62.85
M4	1	1.00	1.59	59.11
M5	3	4.01	6.45	60.73
M6	1	1.00	1.76	75.77
M7	3	4.01	6.35	58.12
M8	2	2.00	3.20	59.93
M9	3	4.01	6.43	60.13

Tabla 54. Cuantificación de glucosa con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

GLUCOSA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	10.95	17.22	57.32
M2	2	5.50	9.57	73.98
M3	1	2.75	4.89	77.99
M4	3	10.94	17.60	60.79
M5	1	2.75	4.84	75.90
M6	1	2.75	5.28	92.10
M7	2	5.50	11.02	100.39
M8	3	10.95	17.54	60.23
M9	2	5.50	10.03	82.38

Tabla 55. Cuantificación de HMF con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica

HMF			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	0.20	0.17	-12.62
M2	1	0.05	NO IDENTIFICADO	
M3	1	0.05	NO IDENTIFICADO	
M4	3	0.20	0.19	-4.82
M5	3	0.20	0.17	-14.15
M6	2	0.10	NO IDENTIFICADO	
M7	2	0.10	NO IDENTIFICADO	
M8	2	0.10	NO IDENTIFICADO	
M9	1	0.05	NO IDENTIFICADO	

Tabla 56. Cuantificación de lactato de etilo con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

LACTATO DE ETILO			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	5.24	7.96	51.83
M2	1	1.30	2.10	61.32
M3	2	2.60	3.36	29.25
M4	2	2.60	4.24	62.93
M5	3	5.24	7.22	37.68
M6	1	1.30	2.23	71.88
M7	1	1.30	2.63	102.74
M8	3	5.24	6.88	31.31
M9	2	2.60	4.00	54.06

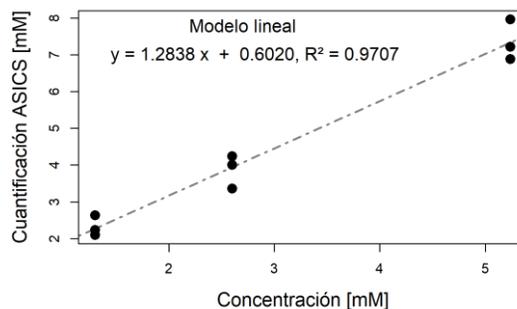


Tabla 57. Cuantificación de metanol con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

METANOL			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	3	12.61	30.98	145.75
M2	1	3.15	7.62	141.82
M3	1	3.15	8.17	159.28
M4	2	6.35	15.01	136.33
M5	1	3.15	7.97	152.92
M6	3	12.61	29.73	135.87
M7	2	6.35	14.86	133.88
M8	3	12.61	30.97	145.71
M9	2	6.35	15.33	141.30

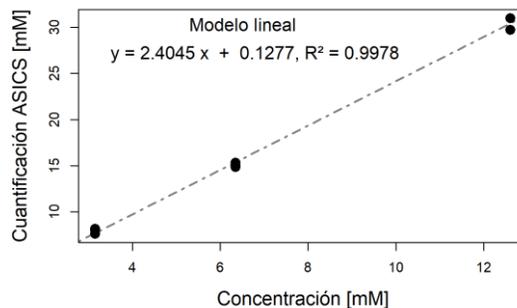


Tabla 58. Cuantificación de prolina con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

PROLINA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	8.70	13.93	60.16
M2	1	4.35	7.03	61.60
M3	3	17.44	23.50	34.74
M4	1	4.35	7.18	65.18
M5	1	4.35	6.98	60.42
M6	2	8.70	13.79	58.44
M7	3	17.44	25.00	43.36
M8	3	17.45	25.43	45.73
M9	2	8.70	13.22	52.03

Tabla 59. Cuantificación de putrescina con ASICS y error relativo a la concentración gravimétrica.

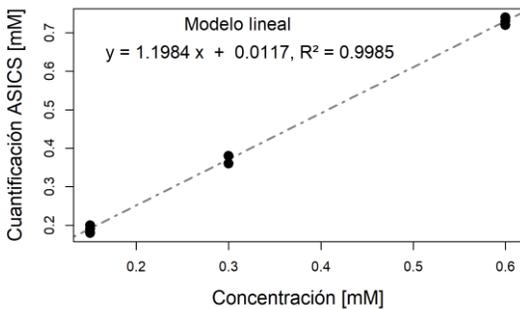
PUTRESCINA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.10	NO IDENTIFICADO	-----
M2	3	0.20	NO IDENTIFICADO	-----
M3	2	0.10	MAL IDENTIFICADO	-----
M4	3	0.20	NO IDENTIFICADO	-----
M5	1	0.05	NO IDENTIFICADO	-----
M6	1	0.05	NO IDENTIFICADO	-----
M7	3	0.20	NO IDENTIFICADO	-----
M8	1	0.05	NO IDENTIFICADO	-----
M9	2	0.10	NO IDENTIFICADO	-----

Tabla 60. Cuantificación de sacarosa con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

SACAROSA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	1.50	3.04	102.41
M2	1	0.75	1.61	115.36
M3	3	3.01	5.52	83.61
M4	3	3.01	6.09	102.71
M5	1	0.75	1.54	104.96
M6	3	3.01	5.85	94.64
M7	2	1.50	3.08	105.27
M8	2	1.50	3.11	107.10
M9	1	0.75	1.61	114.51

Tabla 61. Cuantificación de trigonelina con ASICS y error de cuantificación respecto a la concentración gravimétrica. Se muestra la gráfica de Cuantificación ASICS vs Concentración.

TRIGONELINA			ASICS (Estándar interno)	
Mezcla	Nivel	Concentración [mM]	Cuantificación [mM]	Error [%]
M1	2	0.30	0.38	26.40
M2	1	0.15	0.18	21.36
M3	1	0.15	0.20	32.00
M4	3	0.60	0.74	24.23
M5	1	0.15	0.19	24.21
M6	3	0.60	0.73	22.05
M7	2	0.30	0.36	20.62
M8	2	0.30	0.38	25.12
M9	3	0.60	0.72	21.79



Anexo V. Errores en la identificación de ASICS

A continuación se describe un conjunto de errores de identificación en el análisis de mezclas de 38 metabolitos con señales de RMN-¹H traslapadas.

Acetato de Etilo

En los resultados de cuantificación del acetato de etilo se observa que ocurrieron varios errores en su identificación (Tabla 29). En la Figura 19 se muestra el espectro de la mezcla 1 superpuesto con el espectro de acetato de etilo modelado y de la biblioteca. Se observa que las señales del acetato de etilo (singulete 2.07 ppm; cuádruplete 4.13 ppm) se encuentran traslapadas con las señales de la prolina (multiplete 2.06 ppm; multiplete 4.13 ppm), cuyo nivel medio de concentración es de 13.93 mM mientras que el del acetato de etilo es 2.30 mM. Como se puede ver (Figura 19A), el espectro alineado se encuentra desplazado 0.0086 ppm respecto al espectro de la biblioteca, colocándose en el desplazamiento químico de la señal del ácido acético. Se observa que su intensidad no se ajusta a la señal del ácido acético por lo que se presume queda en función del ajuste del cuádruple de 4.13 ppm (Figura 19B), que tampoco se modela correctamente. La misma situación ocurrió en las mezclas 2, 5, 7 y 8.

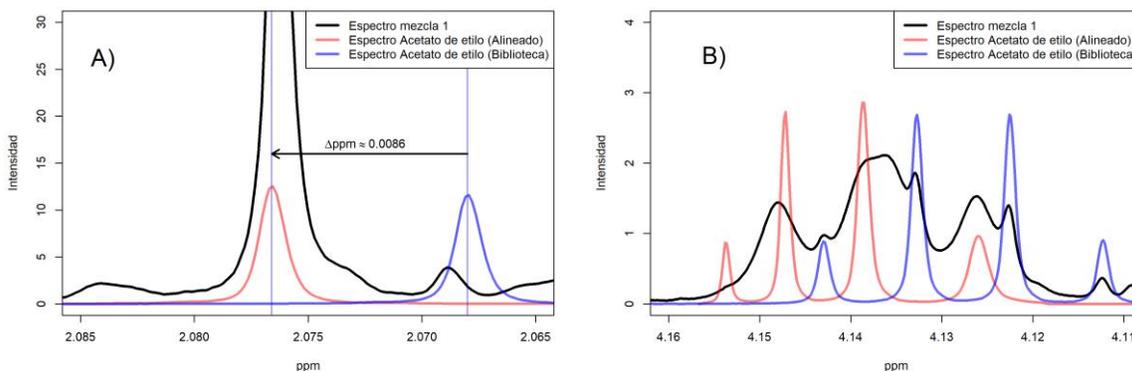


Figura 19. Expansión del espectro de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de la mezcla 1 superpuesto con el espectro del acetato de etilo alineado y de la biblioteca de ASICS.

Ácido acético

Los resultados de cuantificación del ácido acético se presentan en la Tabla 31, se muestra que la identificación tuvo éxito en la mayoría de los casos exceptuando la mezcla 8. La causa de la falla en la identificación se debe a que el singulete característico del ácido

acético (2.08 ppm) fue identificado erróneamente como el singulete del acetato de etilo (2.07 ppm). En la Figura 20 se observa que el espectro modelado del acetato de etilo ocupa el área que corresponde a la señal del ácido acético. Con lo anterior se prueba que el método de ASICS no permite asignar una misma señal a dos compuestos.

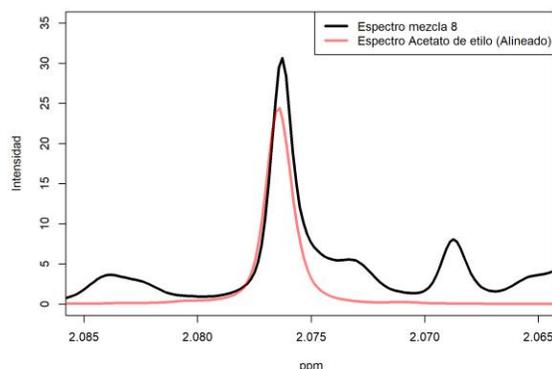


Figura 20. Expansión del espectro de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de la mezcla 8 de 2.085-2.065 ppm, superpuesto con el correspondiente espectro alineado del acetato de etilo.

Ácido glucónico

Los resultados de cuantificación del ácido glucónico se muestran en la Tabla 38, se observa que la identificación no tuvo éxito en las mezclas 2 y 7. Cabe destacar que las señales del ácido glucónico en 4.10 ppm (multiplete) y 4.36 ppm (doblete) se encuentran traslapadas con la señal de la fructosa de 4.09 ppm y la señal del lactato de etilo en 4.37 ppm respectivamente. En la Figura 21 C y D se muestran acercamientos del espectro de la mezcla 4 en la región del ácido glucónico, se observa que la alineación del doblete de 4.36 ppm no fue correcta, no obstante, el multiplete de 4.10 ppm se alineó satisfactoriamente. El ajuste en la intensidad de las señales no fue el adecuado quedando muy por debajo de la intensidad real.

El caso contrario ocurrió con las mezclas 1, 3 y 8. Como ejemplo, en la Figura 21 A y B se muestra el espectro de la mezcla 1, donde se observa que el doblete de 4.36 ppm se alineó de manera correcta, y aunque la alineación del multiplete de 4.10 ppm falló, la cuantificación final fue correcta (cuantificaciones proporcionales a las gravimétricas, tal como se puede confirmar en el modelo lineal presentando en la Tabla 38).

En las mezclas 5, 6 y 9 la alineación fue correcta en ambas señales. En la Figura 21 E y F se muestra como ejemplo el acercamiento del espectro de la mezcla 5.

De acuerdo con el error reportado en la Tabla 38, fue suficiente con que solo una señal se ajustará adecuadamente (en desplazamiento químico e intensidad) para obtener resultados coherentes de cuantificación con respecto a la concentración gravimétrica.

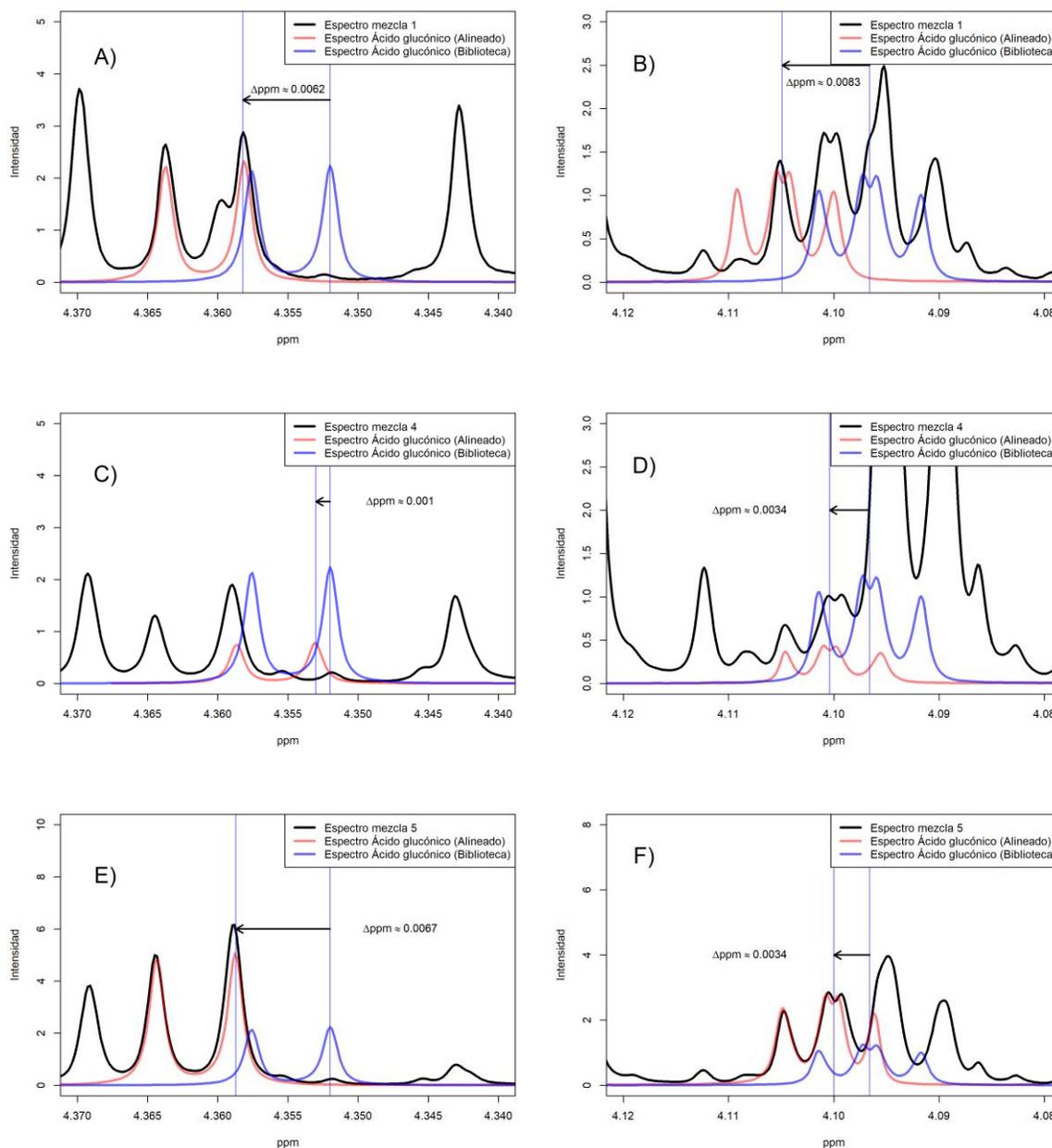


Figura 21. Expansiones en la región del ácido glucónico de los espectros de RMN^{-1}H (700MHz, 300K, EtOH/ $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 6:4) de las mezclas 1 (A, B), 4 (C, D) y 5 (E, F) superpuestos con sus correspondientes espectros de ácido glucónico alineados (rojo) y de la biblioteca (azul).

Ácido pirúvico

Los resultados del ácido pirúvico se presentan en la Tabla 41, se observa que la identificación y cuantificación se realizó con éxito en las mezclas 1, 2, 3, 4, 5 y 9. Cabe resaltar que la señal del ácido pirúvico se solapa con la señal de 2.34 ppm de la prolina, lo que influyó durante la identificación. Al analizar los niveles de concentración de la prolina y del ácido pirúvico en las mezclas 6, 7 y 8 se observa que la concentración de prolina en estas mezclas es mucho mayor que la del ácido pirúvico lo que dificulta su identificación*.

Alanina

Los resultados de la alanina se presentan en la Tabla 46 se observa que la identificación no fue satisfactoria en las mezclas 1, 4, 6, 7 y 9. En la Figura 22A, se muestra el espectro de RMN-¹H de la mezcla 1 superpuesto con el espectro de la alanina (doblete) modelado. Como se puede ver, la señal de la alanina es alineada de manera errónea con un par de señales correspondientes a impurezas, la misma situación ocurrió con las mezclas 4, 6, 7, 9. En la Figura 22B, se muestra el espectro de RMN-¹H de la mezcla 2 superpuesto con el correspondiente espectro de la alanina alineada, en este caso, la identificación fue exitosa puesto que se seleccionó el doblete correcto en el espectro de la mezcla. La constante de acoplamiento J_{H-H} de la alanina es de 7.28 Hz al igual que la distancia entre picos de las señales de impurezas, es probable que esto dificulte la capacidad de ASICS para distinguir ambas señales.

* En las mezclas 6 y 7 el ácido pirúvico se encuentra con el nivel 1 de concentración (0.30 mM), mientras que la prolina tiene el nivel 2 (8.70 mM) y 3 (17.44 mM) respectivamente. En la Mezcla 8 el ácido pirúvico tiene el nivel 2 (0.60 mM) y la prolina el nivel 3 (17.44 mM).

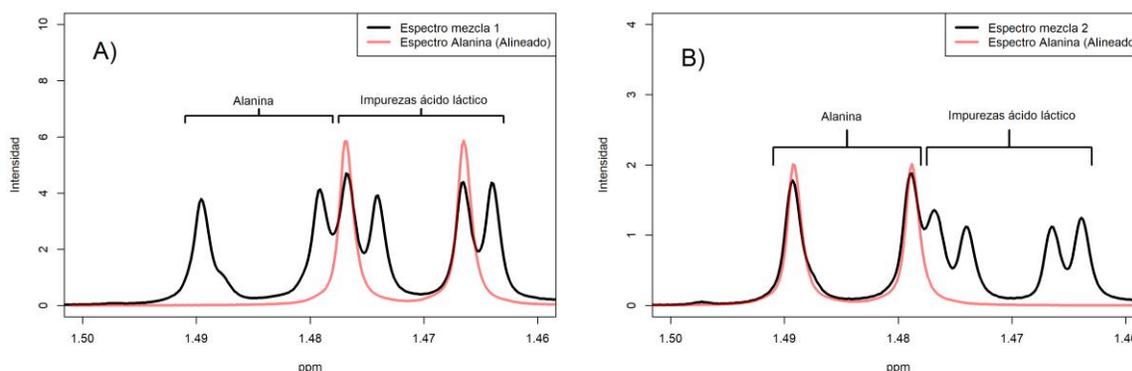


Figura 22. Expansión de los espectros de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) en la región de la alanina de: A) Mezcla 1, B) Mezcla 2. Ambos superpuestos con el correspondiente espectro de alanina alineado.

Arabinosa

En los resultados de la identificación y cuantificación de la arabinosa (Tabla 47) se observa que no fue identificada en las mezclas 3 y 6, debido a que la señal de la arabinosa de 5.22 ppm se traslapa parcialmente con la señal de 5.21 ppm de la glucosa. En la Figura 23 se muestra la expansión en la región de la arabinosa del espectro de RMN- ^1H de la mezcla 3 y 6 superpuesto con el correspondiente espectro de la arabinosa modelado y de la biblioteca. En la Figura 23 A y B se muestran los espectros de la mezcla 3 donde se observa que la señal de 5.22 ppm de la biblioteca se desplaza 0.028 ppm alineándose erróneamente con un doblete característico del ácido glucónico, de igual forma la señal de 4.49 ppm se desplaza 0.027 ppm alineándose de forma incorrecta con la señal del ácido málico. En la mezcla 6 (Figura 23 C y D) ocurrió un problema análogo, con la diferencia de que en este caso el desplazamiento del espectro de la biblioteca fue menor (0.018 y 0.019 ppm) quedando alineadas parcialmente con las mismas señales del ácido glucónico y ácido málico.

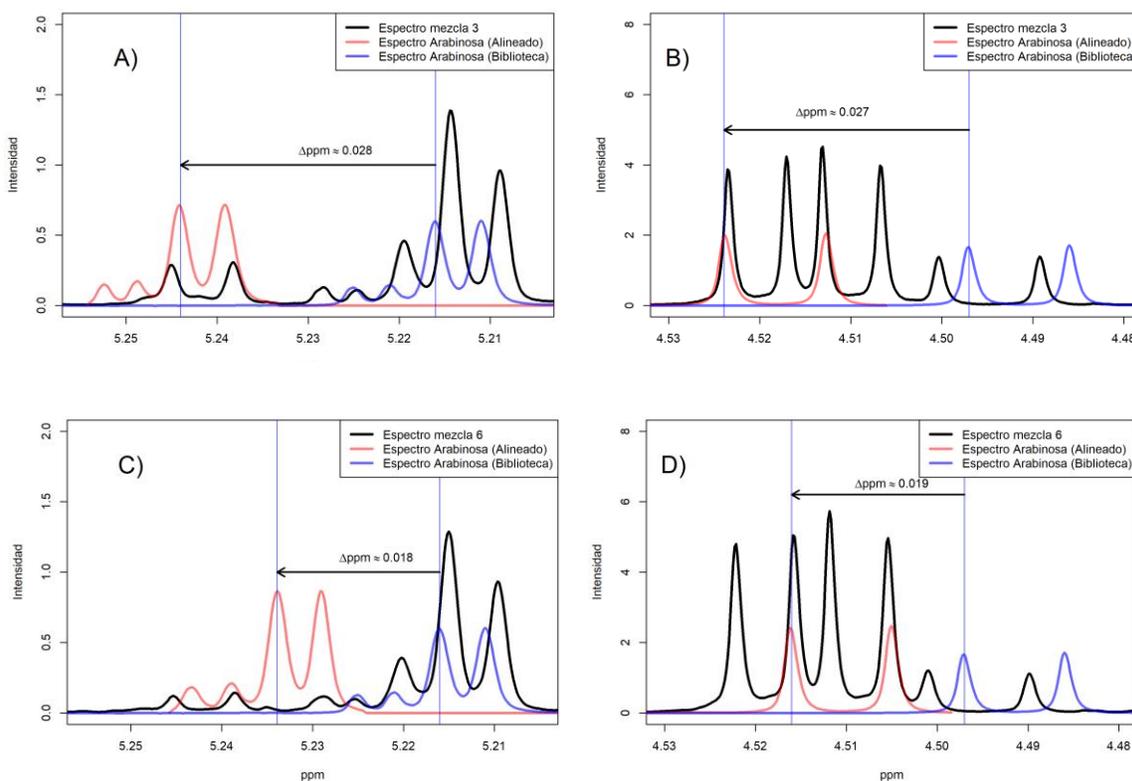


Figura 23. Expansión de los espectros de RMN- ^1H (700MHz, 300K, EtOH/H $_2$ O:D $_2$ O 6:4) de la mezcla 3 (A y B), y de la mezcla 6 (C y D), superpuestos con el correspondiente espectro de la arabinosa alineada (rojo) y de la biblioteca (azul).

Epicatequina

En los resultados de cuantificación de la epicatequina (Tabla 50) se muestra que ASICS falló en la mezcla 8. En la Figura 24 se presentan tres regiones del espectro de la mezcla 8 superpuestas con el espectro de la epicatequina alineada y de la biblioteca. Como se observa en la Figura 24 A y B, el espectro alineado de la epicatequina no se posiciona sobre ningún pico en dos de sus señales. En la Figura 24C se señala con una flecha la señal característica de la epicatequina, se logra ver que el espectro alineado se encuentra posicionado en el lugar incorrecto. La causa de esta falla, que ya se ha presentado en espectros anteriores, no es fácil de identificar puesto que no habría motivo para colocar los espectros en zonas donde no hay señal alguna, sin embargo, parece ser un error recurrente.

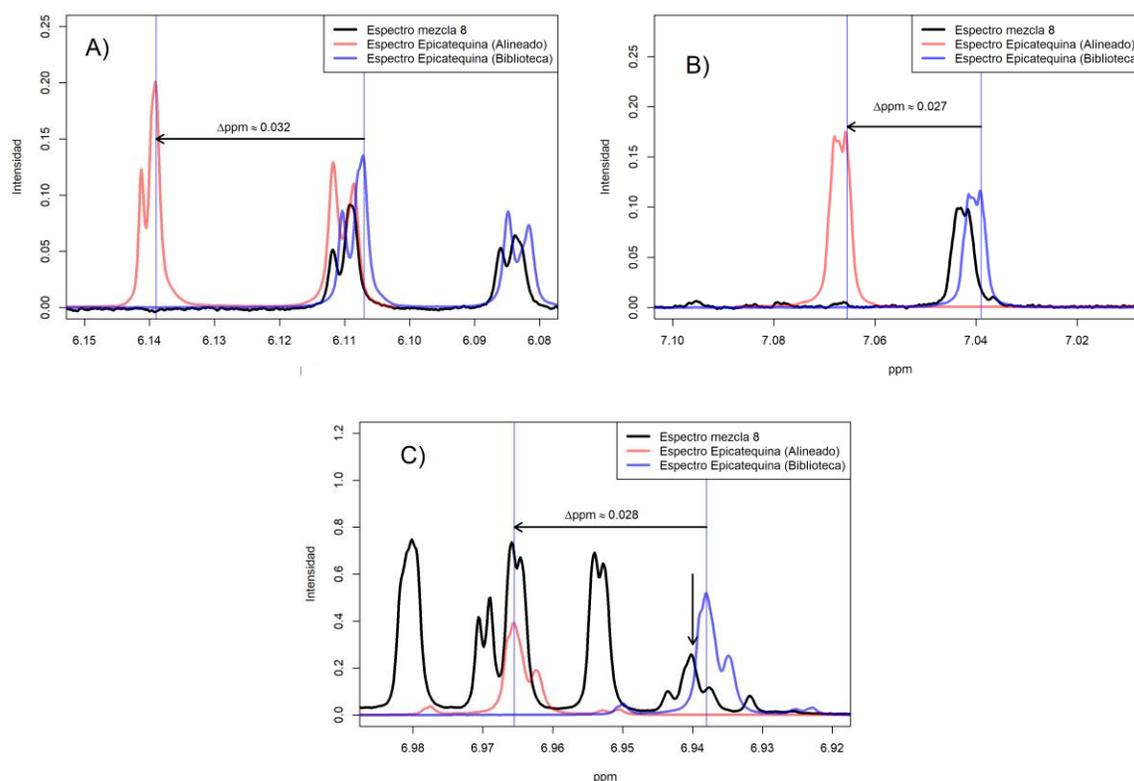


Figura 24. Espectro de RMN-¹H (700 MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de la mezcla 8 superpuesto con el correspondiente espectro de la epicatequina alineado (rojo) y de la biblioteca (azul).

8.1.1.1 Furfural y HMF

Los resultados de cuantificación del furfural y del HMF se muestran en la Tabla 52 y Tabla 55 (Anexo IV), las señales consideradas para la cuantificación de estos compuestos se posicionan en 9.49 ppm (furfural) y 9.45 ppm (HMF). En las mezclas estudiadas este par de señales no se encuentran traslapadas y por lo tanto podría pensarse que su identificación es más sencilla, no obstante, como se observa en las cuantificaciones, la señal del furfural no fue identificada en cuatro mezclas (1, 5, 7, 9) y la del HMF en seis mezclas (2, 3, 6, 7, 8, 9). Las mezclas de furfural donde la identificación no fue exitosa corresponden con el nivel de concentración bajo (mezclas 1, 5, 7) y medio (mezcla 9). Respecto al HMF, sucedió algo similar dado que en todas las mezclas del nivel bajo (2, 3, 9) y nivel medio (6, 7, 8) la identificación no tuvo éxito.

La causa del error en la identificación de estos dos compuestos no logró ser detectada puesto que al analizar los espectros de la biblioteca del HMF y del furfural se descartó la presencia de señales adicionales que pudieran haber sido detectados por el algoritmo de

ASICS. Además, en todos los espectros de las mezclas las señales de estos dos compuestos quedan por arriba del umbral seleccionado (0.005).

8.1.1.2 Ácido shikímico y ácido fumárico

La identificación del ácido shikímico y del ácido fumárico fue correcta en todos los casos, sin embargo, la cuantificación se vio afectada por la presencia de la señal de la arginina en 6.90 ppm que corresponde a los protones del grupo guanidina que generan una señal ancha. En la Figura 25 se muestra a manera de ejemplo el espectro de la mezcla 2 superpuesto con el espectro alineado del ácido shikímico, así como el espectro de la mezcla 3 con el espectro de alineado del ácido fumárico. En ambos casos se observa que la línea base de los espectros alineados se encuentra por debajo de la línea base de los espectros de las mezclas, lo que genera cuantificaciones sobreestimadas.

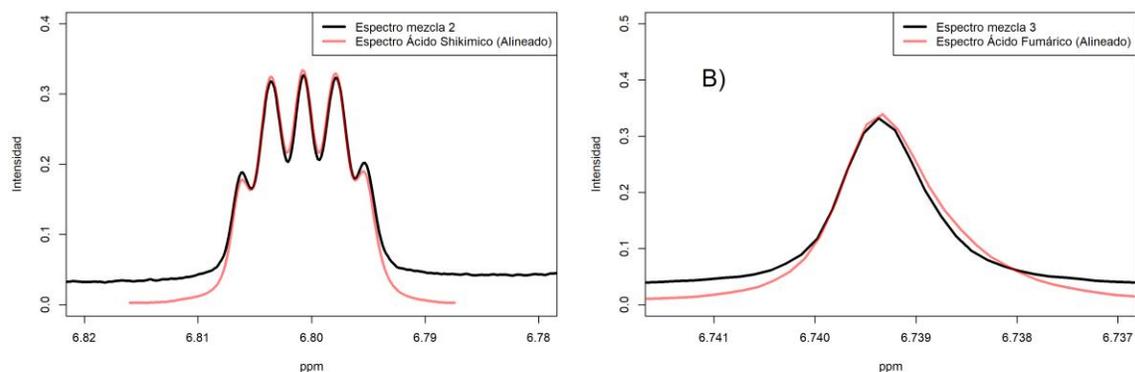


Figura 25. Expansión de los espectros de RMN-¹H (700MHz, 300K, EtOH/H₂O:D₂O 6:4) de: A) Mezcla 2 superpuesto con espectro alineado del ácido shikímico. B) Mezcla 3 superpuesto con espectro alineado del ácido fumárico.

8.1.1.3 Cadaverina y putrescina

Finalmente, respecto a la cadaverina y la putrescina, la identificación no fue exitosa en ninguna de las 9 mezclas. Se presume que la causa radica en la baja concentración de estos compuestos (con un nivel medio de 0.1 mM) además del traslape que sufren con las señales de la arginina (1.91 ppm) que se encuentra con un nivel medio de concentración mucho mayor (2.90 mM).

9. Bibliografía

- [1] J.L. Jungnickel, J.W. Forbes, Quantitative Measurement of Hydrogen Types by Integrated Nuclear Magnetic Resonance Intensities, *Anal Chem.* 35 (1963) 938–942.
- [2] A.H. Emwas, E. Saccenti, X. Gao, R.T. McKay, V.A.P.M. dos Santos, R. Roy, D.S. Wishart, Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine, *Metabolomics.* 14 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>.
- [3] S. Kostidis, R.D. Addie, H. Morreau, O.A. Mayboroda, M. Giera, Quantitative NMR analysis of intra- and extracellular metabolism of mammalian cells: A tutorial, *Anal Chim Acta.* 980 (2017) 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.011>.
- [4] S.G. Villas-Bas, U. Roessner, M.A.E. Hansen, J. Smedsgaard, J. Nielsen, *Metabolome Analysis*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2007. <https://doi.org/10.1002/0470105518>.
- [5] W.J. Griffiths, ed., *Metabolomics, Metabonomics and Metabolite Profiling*, The Royal Society of Chemistry, 2007. <https://doi.org/10.1039/9781847558107>.
- [6] A.H. Emwas, R. Roy, R.T. McKay, L. Tenori, E. Saccenti, G.A. Nagana Gowda, D. Raftery, F. Alahmari, L. Jaremko, M. Jaremko, D.S. Wishart, NMR spectroscopy for metabolomics research, *Metabolites.* 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/metabo9070123>.
- [7] D. Tulpan, S. Léger, L. Belliveau, A. Culf, M. Čuperlović-Culf, MetaboHunter: An automatic approach for identification of metabolites from ¹H-NMR spectra of complex mixtures, *BMC Bioinformatics.* 12 (2011). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-400>.
- [8] D. Cañueto, J. Gómez, R.M. Salek, X. Correig, N. Cañellas, rDolphin: a GUI R package for proficient automatic profiling of 1D ¹H-NMR spectra of study datasets, *Metabolomics.* 14 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1319-y>.
- [9] J. Hao, M. Liebeke, W. Astle, M. De Iorio, J.G. Bundy, T.M.D. Ebbels, Bayesian deconvolution and quantification of metabolites in complex 1D NMR spectra using BATMAN, *Nat Protoc.* 9 (2014) 1416–1427. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.090>.

- [10] S. Ravanbakhsh, P. Liu, T.C. Bjordahl, R. Mandal, J.R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu, C. Luchinat, R. Greiner, D.S. Wishart, Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics, *PLoS One*. 10 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124219>.
- [11] S.H.M. Mehr, A.W. Tang, R.R. Laing, Automated qualitative and quantitative analysis of complex forensic drug samples using ^1H NMR, *Magnetic Resonance in Chemistry*. (2022). <https://doi.org/10.1002/mrc.5265>.
- [12] P.J.C. Tardivel, C. Canlet, G. Lefort, M. Tremblay-Franco, L. Debrauwer, D. Concordet, R. Servien, ASICS: an automatic method for identification and quantification of metabolites in complex 1D ^1H NMR spectra, *Metabolomics*. 13 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1244-5>.
- [13] G. Lefort, L. Liaubet, C. Canlet, P. Tardivel, M.C. Père, H. Quesnel, A. Paris, N. Iannuccelli, N. Vialaneix, R. Servien, J. Kelso, ASICS: An R package for a whole analysis workflow of 1D ^1H NMR spectra, *Bioinformatics*. 35 (2019) 4356–4363. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz248>.
- [14] G. Lefort, L. Liaubet, N. Marty-Gasset, C. Canlet, N. Vialaneix, R. Servien, Joint Automatic Metabolite Identification and Quantification of a Set of ^1H NMR Spectra, *Anal Chem*. 93 (2021) 2861–2870. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04232>.
- [15] M. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd, England, 2008.
- [16] Horst Friebolin, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 5th ed., John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- [17] Harald Günther, *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2013.
- [18] James Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, 2010.
- [19] *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-04654-8>.

- [20] C. Simmler, J.G. Napolitano, J.B. McAlpine, S.N. Chen, G.F. Pauli, Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples, *Curr Opin Biotechnol.* 25 (2014) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.004>.
- [21] C. Fujimoto, Y. Muramatsu, M. Suzuki, Y. Hirata, K. Jinno, Y. Li, C. Sziintay, High-field NMR spectroscopy as an analytical tool for quantitative determinations: pitfalls, limitations and possible solutions, *J. High Resolut. Chromatogr.* 17 (1989) 178.
- [22] S.K. Bharti, R. Roy, Quantitative ^1H NMR spectroscopy, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* 35 (2012) 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>.
- [23] S. Akoka, L. Barantin, M. Trierweiler, Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method, *Anal Chem.* 71 (1999) 2554–2557. <https://doi.org/10.1021/ac981422i>.
- [24] R.D. Farrant, J.C. Hollerton, S.M. Lynn, S. Provera, P.J. Sidebottom, R.J. Upton, NMR quantification using an artificial signal, *Magnetic Resonance in Chemistry.* 48 (2010) 753–762. <https://doi.org/10.1002/mrc.2647>.
- [25] F. Ziarelli, S. Viel, S. Caldarelli, D.N. Sobieski, M.P. Augustine, General implementation of the ERETICTM method for pulsed field gradient probe heads, *Journal of Magnetic Resonance.* 194 (2008) 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.07.013>.
- [26] G. Wider, L. Dreier, Measuring protein concentrations by NMR spectroscopy, *J Am Chem Soc.* 128 (2006) 2571–2576. <https://doi.org/10.1021/ja055336t>.
- [27] A.M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, C.M. Slupsky, Targeted profiling: Quantitative analysis of ^1H NMR metabolomics data, *Anal Chem.* 78 (2006) 4430–4442. <https://doi.org/10.1021/ac060209g>.
- [28] C. Cassino, C. Tsolakis, F. Bonello, V. Gianotti, D. Osella, Effects of area, year and climatic factors on Barbera wine characteristics studied by the combination of ^1H -NMR metabolomics and chemometrics, *J Wine Res.* 28 (2017) 259–277. <https://doi.org/10.1080/09571264.2017.1388225>.
- [29] P.A. Solovyev, C. Fauhl-Hassek, J. Riedl, S. Esslinger, L. Bontempo, F. Camin, NMR spectroscopy in wine authentication: An official control perspective, *Compr*

- Rev Food Sci Food Saf. 20 (2021) 2040–2062. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12700>.
- [30] L. Gougeon, G. Da Costa, I. Le Mao, W. Ma, P.L. Teissedre, F. Guyon, T. Richard, Wine Analysis and Authenticity Using ¹H-NMR Metabolomics Data: Application to Chinese Wines, *Food Anal Methods*. 11 (2018) 3425–3434. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1310-2>.
- [31] R. Godelmann, C. Kost, C.D. Patz, R. Ristow, H. Wachter, Quantitation of compounds in wine using ¹H NMR spectroscopy: Description of the method and collaborative study, *J AOAC Int*. 99 (2016) 1295–1304. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0318>.
- [32] R. Godelmann, F. Fang, E. Humpfer, B. Schütz, M. Bansbach, H. Schäfer, M. Spraul, Targeted and nontargeted wine analysis by ¹H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. differentiation of important parameters: Grape variety, geographical origin, year of vintage, *J Agric Food Chem*. 61 (2013) 5610–5619. <https://doi.org/10.1021/jf400800d>.
- [33] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, *Handbook of Enology*, Wiley, 2006. <https://doi.org/10.1002/0470010398>.
- [34] Y. Fujiwara, F. Shizuo, Nuclear Magnetic Resonance Study of Acetaldehyde Aqueous Solution, *Bull Chem Soc Jpn*. 36 (1963) 574–578. <https://doi.org/10.1246/bcsj.36.574>.
- [35] R. Zhao, A.K.Y. Lee, R. Soong, A.J. Simpson, J.P.D. Abbatt, Formation of aqueous-phase α -hydroxyhydroperoxides (α -HHP): Potential atmospheric impacts, *Atmos Chem Phys*. 13 (2013) 5857–5872. <https://doi.org/10.5194/acp-13-5857-2013>.