



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación</b>
Autor/es
<b>Eva López Rituerto</b>
Director/es
Jesús Manuel Peregrina García y Jesús Héctor Busto Sancirán
Facultad
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico
2011-2012



**La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación**, tesis doctoral

de Eva López Rituerto, dirigida por Jesús Manuel Peregrina García y Jesús Héctor Busto Sancirán (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



**UNIVERSIDAD  
DE LA RIOJA**

FACULTAD DE CIENCIAS, ESTUDIOS  
AGROALIMENTARIOS E INFORMÁTICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
ÁREA DE QUÍMICA ORGÁNICA

Centro de Investigación en Síntesis Química de La Rioja  
C.I.S.Q. – U.A. C.S.I.C.  
Grupo de Síntesis Orgánica Estereoselectiva

TESIS DOCTORAL

LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR COMO  
HERRAMIENTA EN EL ESTUDIO Y CONTROL DEL  
PROCESO DE VINIFICACIÓN

Memoria presentada en la Universidad de La Rioja para optar al grado de  
Doctor en Química por:

**Eva López Rituerto**

**Febrero 2012**



**JESÚS MANUEL PEREGRINA GARCÍA**, Catedrático de Química Orgánica  
del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja y

**JESÚS HÉCTOR BUSTO SANCIRIÁN**, Profesor Titular de Química Orgánica  
del Departamento de Química de la Universidad de La Rioja

**CERTIFICAN:**

Que la memoria **“La resonancia magnética nuclear como herramienta en el estudio y control del proceso de vinificación”** ha sido realizada por la Licenciada **Eva López Rituerto** en el Departamento de Química de la Universidad de La Rioja, bajo su inmediata dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Química.

Logroño, Febrero 2012

Fdo.: Jesús Manuel Peregrina García

Fdo.: Jesús Héctor Busto Sancirían



*A Carlos,  
A mis padres,  
A Tomás y Mateo*





Cuando comencé mi tesis doctoral, como supongo le habrá pasado a la mayoría, no podía ver más allá de unos cursos de doctorado, un tiempo de investigación, una defensa pública de tesis, el temido tribunal y la nota final. Pero una vez que avanzan los días y te ves envuelto en la dinámica de la universidad, descubres que realizar una tesis engloba mucho más que lo meramente científico.

Un grupo de investigación es algo dinámico, en el que no sólo cambia el trabajo diario sino también las personas que lo conforman. Cuando llegas, son los veteranos los que te guían, te enseñan y animan en los duros comienzos. Después, éstos dejan paso a los nuevos doctorandos que son los que llenan de juventud, desparpajo y alegría el laboratorio. En ambientes como éstos, en los que se logra un equilibrio entre la ciencia y la amistad, es donde se favorece el desarrollo de una tesis.

En mi caso, si en algún momento he estado próxima de conseguir este equilibrio es gracias a las personas que me han acompañado a lo largo de estos años y a las que espero yo también haya ayudado en su vida diaria.

En especial quiero agradecer a mis directores Héctor y Pere su apoyo y confianza puesta en mí para llevar a cabo un trabajo, que aunque poco tenía que ver con el del resto del grupo, siempre promovieron con gran entusiasmo y motivación. También me gustaría resaltar su paciencia y comprensión al permitirme compaginar el doctorado con mis estudios de enología. Del mismo modo también quiero agradecer a Alberto y Marimar su apoyo y sus consejos a lo largo de estos años.

Sin olvidarme del resto de los compañeros que forman parte de este grupo de investigación, cada vez más numeroso, (Paco, Fer, Lara, Nuria, Víctor S, Víctor R, Iván, Madariaga...) y del grupo de las *viejas glorias* del que pronto formaré parte

(Noelia, Marta, Iván, Marisa, Alberto, Javi...) y por supuesto de Charlie, un pilar clave en mi día a día.

Al igual que a nuestros vecinos los fotoquímicos y a todos los que conformáis el Departamento de Química.

A todos vosotros, gracias.

También me gustaría agradecer el apoyo recibido por parte del Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja y de su presidente, D. Víctor Pascual, que nos facilitó el acceso a las bodegas que han aportado muestras de mosto y vino para nuestro trabajo:

- Bodega Cooperativa Nuestra señora de Vico, Arnedo.
- Sociedad Cooperativa Viñedos de Aldeanueva, Aldeanueva de Ebro.
- Sociedad Cooperativa Vinícola Riojana de Alcanadre, Alcanadre.
- Bodega Cooperativa Interlocal Virgen de la Vega, Haro.
- Sociedad Cooperativa B. Interlocal del Najerilla, Arenzana de Abajo.
- Sociedad Cooperativa Unión de Cosecheros de Labastida, Labastida.
- Sociedad Cooperativa Ltda. Comarcal de Navarrete, Navarrete.
- Bodega Cooperativa Vinícola San Cebrín, San Asensio.
- Bodegas Altanza, Fuenmayor.
- Bodega Dinastía Vivanco, Briones.
- Bodegas Patrocinio S.C.L, Uruñuela.

Del mismo modo se hace extensible este agradecimiento a la profesora Susana Cabredo por su apoyo y sus consejos a lo largo de estos años, así como a Belén Ayestarán por las muestras facilitadas y a J. Federico Echávarri, por permitirme utilizar el equipo Foss WineScan<sup>TM</sup> FT 120.

Por último, me gustaría agradecer a las siguientes instituciones todo el apoyo económico aportado para el desarrollo de esta investigación:

- Ministerio de Ciencia e Innovación por la aportación económica a los diferentes proyectos (CTQ2006-05825/BQU y CTQ2009-13814/BQU)
- Universidad de La Rioja, por la concesión de la beca predoctoral (FPI-UR-08/16606813P) y por su apoyo en forma de ayudas a Tesis Doctorales (ATUR) así como por conformar el marco tecnológico idóneo para el desarrollo de este trabajo.
- Instituto de Estudios Riojanos (IER), por las ayudas de temática riojana concedidas en los años 2007, 2008, 2009 y 2010.



# RESUMEN

En esta tesis doctoral se ha presentado la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) como una herramienta muy útil en el campo de la enología. A lo largo de este trabajo ha quedado plasmado el gran potencial que tiene el RMN en el estudio del vino, no sólo desde el punto de vista cualitativo y estructural sino también desde el punto de vista cuantitativo. Además es una técnica no invasiva con la muestra y los tratamientos previos sobre la misma son muy rápidos y sencillos. El vino está formado por numerosos compuestos de origen orgánico que pueden ser estudiados a través de los espectros de RMN de protón y de carbono-13. En los diferentes capítulos de esta tesis se han estudiado ambos núcleos con el fin de obtener la mayor información posible de los procesos de vinificación.

En el capítulo 4, se ha puesto a punto la metodología de RMN cuantitativo sobre muestras de vino mediante el seguimiento metabólico de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Dicha técnica fue validada y después utilizada para la cuantificación de numerosos compuestos a lo largo de la elaboración de dos vinos, uno joven y otro envejecido en bodega. También se utilizó dicha metodología para poner a punto las microfermentaciones alcohólicas a temperatura controlada y con toma de datos de forma continua en un tubo de RMN.

En el capítulo 5, los espectros de RMN de protón fueron utilizados junto a métodos quimiométricos de clasificación para estudiar y clasificar muestras de mosto y vino recogidas a lo largo de la D.O.Ca. Rioja. A través de esta metodología se pudieron encontrar como biomarcadores del origen del vino al isopentanol y al isobutanol.

En el capítulo 6 se ha puesto a punto la metodología para el estudio metabólico de los aminoácidos a lo largo de la fermentación alcohólica y maloláctica. Con la

adición de aminoácidos marcados isotópicamente con carbono-13 se ha podido observar la transformación en su alcohol superior y en su amina correspondiente, en función de las levaduras y bacterias lácticas empleadas.

# ABSTRACT

In this doctoral thesis we have presented the technique of nuclear magnetic resonance (NMR) as a useful tool in the field of enology. Throughout this work it has been captured the great potential of NMR in the study of wine, not only from the standpoint of qualitative and structural but also from the quantitative point of view. It is also a non-invasive technique with the sample and whose previous treatments are very quick and easy. Wine is composed of numerous compounds of organic origin and they can be studied through proton and carbon-13 NMR spectra. In each chapter of this thesis both nuclei have been studied in order to obtain as much information as possible from the vinification processes.

In Chapter 4, it has been developed the quantitative NMR methodology for samples of wine during metabolic monitoring alcoholic and malolactic fermentations. This technique was validated and then used for quantification of many compounds over the development of two wines, a young wine and other aged in oak barrels. This methodology was also used to study controlled alcoholic micro-fermentations and data collection continuously in a NMR tube.

In Chapter 5, the proton NMR spectra with chemometric classification methods were used to study and classify samples of must and wine collected over the D.O.Ca. Rioja. Through this methodology isopentanol and isobutanol could be found as biomarkers of the origin of wine.

In Chapter 6 it has been developed the methodology for metabolic study of amino acids during alcoholic and malolactic fermentation. With the addition of carbon-13 labeled amino acids, it has been observed the transformation of amino acids in their corresponding higher alcohol and amine.





# ÍNDICE

<b>Abreviaciones</b> .....	<b>I</b>
----------------------------	----------

## Capítulo 1

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1. Cultura vitivinícola .....	3
1.2. Composición del vino .....	6
1.3. Fermentación alcohólica .....	11
1.3.1. <i>Bioquímica del proceso</i> .....	11
1.3.2. <i>Materia nitrogenada</i> .....	18
1.4. Fermentación maloláctica .....	22
1.5. Crianza en barrica .....	29

## Capítulo 2

<b>Antecedentes y objetivos</b> .....	<b>33</b>
2.1. Historia de la resonancia magnética nuclear .....	37
2.2. Aplicaciones de la resonancia magnética nuclear .....	39
2.3. Objetivos .....	47

## Capítulo 3

<b>Material y métodos</b> .....	<b>49</b>
3.1. Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	51
3.1.1. <i>Fundamentos básicos del RMN</i> .....	51
3.1.2. <i>Equipos de RMN empleados</i> .....	54

3.1.3. <i>Adquisición y procesado de los espectros de RMN</i> .....	57
3.2. <i>Análisis mediante infrarrojo</i> .....	73
3.3. <i>Análisis mediante test enzimático</i> .....	74
3.3.1. <i>Análisis del ácido málico</i> .....	74
3.3.2. <i>Análisis del ácido láctico</i> .....	75
3.4. <i>Métodos quimiométricos</i> .....	77
3.4.1. <i>Análisis de componentes principales (PCA)</i> .	77
3.4.2. <i>Análisis de variables canónicas extendidas (ECVA)</i> <i>y de intervalos (iECVA)</i> .....	81

## Capítulo 4

<b>Evolución y cuantificación de metabolitos del vino empleando la resonancia magnética nuclear</b> .....	<b>85</b>
4.1. <i>Introducción y antecedentes</i> .....	87
4.2. <i>Puesta a punto del método</i> .....	91
4.2.1. <i>Cuantificación del ácido málico y ácido láctico</i> .....	91
4.3. <i>Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de la elaboración de un vino joven de la D.O.Ca. Rioja</i> .....	101
4.3.1. <i>Cuantificación de otros compuestos mediante     patrón externo</i> .....	101
4.3.2. <i>Cuantificación de otros compuestos mediante     otros métodos</i> .....	104
4.3.3. <i>Cuantificación aromática de otros compuestos en muestras     de vino. Comparación con el método de infrarrojo</i> .....	105
4.4. <i>Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de polifenoles durante la elaboración de un vino crianza de la D.O.Ca. Rioja</i> .....	124
4.4.1. <i>Cuantificación de polifenoles mediante patrón externo</i> .....	124

4.4.2. Seguimiento de los polifenoles y de otros compuestos durante la elaboración de un vino crianza .....	129
4.5. Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN .....	138

## Capítulo 5

<b>La resonancia magnética nuclear de protón y métodos quimiométricos .....</b>	<b>143</b>
5.1. Aplicación de la RMN de protón y la quimiometría a estudio de la trazabilidad de mostos y vinos de la D.O.Ca. Rioja .....	145
5.1.1. Introducción y antecedentes .....	145
5.1.2. Espectros de RMN de protón de las muestras de las cooperativas .....	149
5.1.3. Empleo del análisis de componentes principales (PCA) .....	158
5.1.3. Empleo del análisis de variables canónicas extendidas de intervalos (iECVA) .....	166

## Capítulo 6

<b>Seguimiento metabólico de aminoácidos en el proceso de elaboración del vino empleando la resonancia magnética nuclear de carbono-13 .....</b>	<b>177</b>
6.1. Introducción y antecedentes .....	179
6.2. Seguimiento metabólico de los aminoácidos leucina, isoleucina y fenilalanina durante la fermentación alcohólica de un vino .....	183

6.2.1. Fermentación alcohólica. Transformación de los aminoácidos leucina, isoleucina y fenilalanina en sus alcoholes superiores .....	183
6.3. Seguimiento metabólico del aminoácido histidina durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica de un vino .....	193
6.3.1. Fermentación alcohólica. Transformación del aminoácido histidina en su alcohol superior .....	195
6.3.2. Fermentación maloláctica. Transformación del aminoácido histidina en su amina .....	202

## **Capítulo 7**

<b>Conclusiones .....</b>	<b>209</b>
---------------------------	------------

## **Capítulo 8**

<b>Anexos de RMN .....</b>	<b>217</b>
----------------------------	------------

## ABREVIACIONES

$\delta$	desplazamiento químico
$\mu\text{s}$	microsegundos
$\mu\text{L}$	microlitros
$\sigma$	desviación estándar
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius
$^{13}\text{C}$	carbono 13
$^1\text{H}$	protón
$A_A$	integral absoluta del analito
<b>ac.</b>	ácido
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	análisis de la varianza
<b>ATP</b>	adenin trifosfato
<b>ARN</b>	ácido ribonucleico
<b>ATUR</b>	Ayudas para la realización de Tesis Doctorales en la Universidad de La Rioja
$B_0$	campo magnético
<b>C</b>	concentración
$C_A$	concentración del analito
<b>CE</b>	electroforesis capilar
<b>CP</b>	componente principal
$C_{PE}$	concentración del patrón externo
<b>CVA</b>	análisis de correlación canónica ( <i>Canonical Variates Analysis</i> )
<b>d</b>	doblete
<b>D1</b>	retardo entre pulsos
<b>dB</b>	decibelios
<b>dd</b>	doblete de dobletes
<b>D(-)LDI</b>	enzima láctico deshidrogenasa dextrógira

<b>D.O.Ca.</b>	Denominación de Origen Calificada
<b>DSC/TG</b>	calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría
<b>ECVA</b>	análisis de variables canónicas extendidas ( <i>Extended Canonical Variates Analysis</i> )
<b>EM</b>	enzima málico; multiplicación exponencial
<b>EML</b>	enzima maloláctica
<b>FAN</b>	nitrógeno fácilmente asimilable
<b>FID</b>	caída libre de inducción ( <i>Free Induction Decay</i> )
<b>FT</b>	transformada de Fourier
<b>FTIR</b>	espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
<b>GC</b>	cromatografía de gases
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>g/L</b>	gramos por litro
<b>HDC</b>	enzima histidina descarboxilasa
<b>HPLC</b>	cromatografía líquida a alta presión
<b>HSQC</b>	correlación $^1\text{H}$ -heteronúcleo
<b>Hz</b>	hertzio
<b>ICOSHIFT</b>	<i>Interval Correlation Optimized Shifting</i>
<b>iECVA</b>	análisis de variables canónicas extendidas de intervalos ( <i>Interval Extended Canonical Variates Analysis</i> )
<b>IER</b>	instituto de estudios riojanos
<b>IM</b>	índice de madurez
<b>IR</b>	infrarrojo
<b>IRM</b>	resonancia magnética de imágenes
<b>iPLS</b>	mínimos cuadrados parciales de intervalos ( <i>Interval Partial Least Squares</i> )
<b>J</b>	constante de acoplamiento
<b><math>^3J</math></b>	constante de acoplamiento a través de tres enlaces

<b><i>k</i></b>	constante de cuantificación
<b>Kcal</b>	kilocalorías
<b>LB</b>	ensanchamiento de señal ( <i>Line Broadening</i> )
<b>L(+)<b>LDI</b></b>	enzima láctico deshidrogenasa levógira
<b>Log</b>	logaritmo decimal
<b>LSA</b>	levaduras secas activas
<b>Ltda.</b>	limitada
<b>L/m<sup>2</sup></b>	litros por metro cuadrado
<b>m</b>	multiplete
<b>mg</b>	miligramos
<b>MHz</b>	megahertzios
<b>mL</b>	mililitros
<b>MLI</b>	enzima málico deshidrogenasa
<b>mmol</b>	milimoles
<b>mmol/L</b>	milimoles por litro
<b>mol/L</b>	moles por litro
<b>MS</b>	espectrometría de masas
<b><i>N<sub>A</sub></i></b>	número de protones para la señal del analito
<b>NAD<sup>+</sup></b>	nicotinamida adenin dinucleótido forma oxidada
<b>NADH</b>	nicotinamida adenin dinucleótido forma reducida
<b>NOE</b>	efecto nuclear Overhauser ( <i>Nuclear Overhauser Effect</i> )
<b><i>N<sub>PE</sub></i></b>	número de protones para el patrón externo
<b>OIV</b>	Organización Internacional de la Viña y el Vino
<b>P1</b>	pulso de excitación
<b>PCA</b>	análisis de componentes principales
<b>PLS</b>	mínimos cuadrados parciales ( <i>Partial least squares</i> )
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>qNMR</b>	Resonancia Magnética Nuclear cuantitativa, ( <i>Quantitative NMR</i> )

<b>R<sup>2</sup></b>	coeficiente de determinación
<b>RG</b>	ganancia del receptor ( <i>Receiver Gain</i> ).
<b>RGA</b>	RG automático
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>s</b>	segundo; singlete
<b>S.C.L.</b>	Sociedad Cooperativa Limitada
<b>t</b>	tripleto
<b>TSP</b>	sal sódica del ácido 2,2,3,3-d <sub>4</sub> -(trimetilsilil)propanoico
<b>UFC</b>	unidades formadoras de células
<b>UV</b>	ultravioleta
<b>v/v</b>	grado alcohólico expresado en porcentaje



## El vino

Su aroma, su color, su sabor, su estructura, su equilibrio, su veteranía y sabiduría, su juventud, su complejidad y a la vez su simpleza, los recuerdos que despierta, la alegría que genera... son muchos los motivos que hacen del vino algo diferente, especial, que nos acompaña en los mejores momentos y con el que muchos riojanos hemos crecido de la mano, viviendo su cultura.

La yema, el desborre, la floración, el cuajado, el envero, por fin la vendimia, las fermentaciones, el envejecimiento en la barrica, en la botella, y por último el consumidor, la pieza angular de todo este proceso. El que da valor a nuestras uvas, a nuestras viñas, a nuestro trabajo, al que se le debe todo y por el que tiene sentido intentar cada día entender el vino, su vida y desarrollo con el fin de mejorarlo.

Atrás quedan los días eternos en el campo, las complicadas vendimias, las levaduras rebeldes, el terrible picado del vino, el olor a corcho, las discusiones, el cansancio... Todo queda atrás, cuando por fin tienes tu vino, y todo se olvida en el primer sorbo, se diluye y comienza una nueva etapa, un nuevo propósito...



Esto es la simpleza de lo bien hecho...un buen vino.

*Eva López Rituerto*



# Capítulo 1

## Introducción

- 1.1. Cultura vitivinícola.
- 1.2. Composición del vino.
- 1.3. Fermentación alcohólica.
  - 1.3.1. *Bioquímica del proceso.*
  - 1.3.2. *Materia nitrogenada.*
- 1.4. Fermentación maloláctica.
- 1.5. Crianza en barrica.



## 1.1. Cultura vitivinícola

El vino está presente en nuestra cultura desde el tiempo de los romanos<sup>1</sup> que extendieron su cultivo por todo su imperio, y ha evolucionado hasta nuestros días, sobreponiéndose a plagas, enfermedades y contratiempos, que la vida, y otras veces el hombre, le ha puesto.

A lo largo de los años el modo de elaboración del vino ha ido cambiando con el conocimiento y el desarrollo tecnológico. Así, los viñedos se han transformado, controlando parámetros como la vigorosidad, la exposición al sol o la aireación, que tanta repercusión tienen sobre la calidad. Los vinos han mejorado no sólo por el buen estado de las uvas sino también, gracias al conocimiento de los procesos de elaboración que nos han permitido mejorar su calidad y desarrollar metodologías nuevas de vinificación.

En diversas zonas de La Rioja se pueden ver los viejos lagares donde se elaboraba el vino antiguamente y que aún ahora se utilizan para obtener vino mediante maceración carbónica. Actualmente, la gran mayoría de bodegas utilizan para elaborar el vino depósitos de acero inoxidable debido a numerosas ventajas, de las que cabe destacar la facilidad de controlar la temperatura (Figura 1.1).

---

<sup>1</sup> Hornsey I. *The Chemistry and Biology of Winemaking*. The Royal Society of Chemistry 2007.



**Figura 1.1.** Foto de un lagar y de depósitos de acero inoxidable.

Existen tres tipos de vinos en función de la variedad de uva empleada y el color final del mismo (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Tipos de vinos: tinto, blanco y rosado.

- El **blanco**, elaborado a partir de uva de variedad blanca como la viura o el verdejo. Habitualmente sólo se realiza la fermentación alcohólica del mosto limpio. Se caracteriza fundamentalmente por sus aromas varietales y frutales y su acidez y frescor en boca.
- El **tinto**, elaborado a partir de uva de variedad tinta como el tempranillo o la garnacha. La fermentación alcohólica se realiza en contacto con las pieles u hollejos y con las pepitas. También se realiza una segunda

fermentación, la maloláctica, que disminuye la acidez del vino y le da suavidad. Una vez terminadas las fermentaciones se puede consumir como vino joven, caracterizado por los olores y sabores frutales, por las notas lácteas y por el color rojo-violáceo. También el vino puede ser envejecido realizando una crianza, que consiste en un lento periodo oxidativo del vino en barricas de roble y posterior periodo reductor en botellas. Estos vinos se caracterizan por los aromas tostados y torrefactos provenientes de la madera, más estructurados y complejos en boca. Su color suele ser rojo teja.

- El **rosado**, elaborado a partir de uva de variedad tinta como el tempranillo o la garnacha. Habitualmente sólo se realiza la fermentación alcohólica con el mosto limpio, pero antes de realizarla se mantiene el mismo en contacto con las pieles para extraer el color tinto. Se caracteriza por ser un vino fresco con acidez y muchos aromas frutales y varietales.

## 1.2. Composición del vino

El vino es una bebida muy compleja y las diversas sustancias que lo conforman hacen que sea una bebida diferente, en la que actualmente se emplea mucho tiempo y dinero en su investigación.

Con los años han surgido numerosos tipos de vinos y de diferentes zonas vitícolas, todos ellos aún con un matiz común, poseen características diferentes que nos permite acceder a un amplio abanico de vinos. Estas pequeñas diferencias, fundamentales para buenos y no tan buenos catadores, son responsabilidad de los compuestos minoritarios (metabolitos) que surgen del proceso de vinificación.

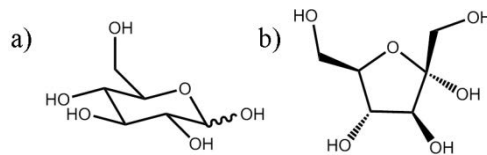
Durante la elaboración del vino tienen lugar numerosos procesos en los que se producen diversas rutas metabólicas. Pero de todas ellas caben destacar los dos procesos principales, la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, los cuales son los responsables de la obtención de un buen vino. El primero es responsable de la formación del componente principal en el vino, el etanol, a partir de los azúcares de la uva. Y el segundo se da principalmente en vinos tintos, siendo el responsable de la estructura que se alcanza con el consumo del ácido málico y la formación del ácido láctico. La mayoría de los enólogos no entienden la elaboración completa de un vino tinto sin la consecución de ambos procesos. Sin embargo, no sólo se obtiene la transformación de estos compuestos sino también de otros muchos, que aunque minoritarios, conforman, como hemos comentado antes, la compleja estructura del vino.

A lo largo de la fermentación del vino, muchos de sus compuestos aparecen y desaparecen en un constante equilibrio, a lo largo de la transformación del mosto en vino. El mosto está compuesto principalmente por agua y azúcares. En cambio, el vino está compuesto por agua y etanol. Pero en ambos casos se pueden distinguir varias familias químicas de compuestos. Éstas son: azúcares, alcoholes, ácidos,



compuestos nitrogenados, minerales, vitaminas, polifenoles y compuestos del aroma. Algunos de estos provienen de la uva y se les denomina varietales; otros en cambio, surgen a lo largo del proceso de vinificación y se les denomina fermentativos; y otros muchos provienen de la crianza, bien como resultado del ambiente oxidativo en la bodega o del reductor de la botella, o bien como resultado del aporte de la bodega al vino.

En el mosto predominan los azúcares. Los más abundantes son la glucosa y la fructosa (Figura 1.3), que además son los únicos consumibles por las levaduras. Pero también están presentes otros monosacáridos como la xilosa<sup>2</sup> o la ribosa<sup>3</sup> y disacáridos como la sacarosa<sup>4</sup> o la lactosa<sup>5</sup> que junto con el resto conforman los azúcares no fermentables por las levaduras, denominados azúcares reductores.



**Figura 1.3.** Moléculas de a) glucosa y b) fructosa.

El alcohol predominante en el vino es el etanol generado en la fermentación alcohólica, pero también existen muchos otros como el metanol o el glicerol, que influyen considerablemente en el paladar del vino. También se encuentran los alcoholes fusel o superiores (de peso molecular superior al etanol) que, aunque minoritarios, influyen en el perfil aromático de los vinos. Éstos se generan a lo largo de la fermentación alcohólica a partir de los aminoácidos.

---

<sup>2</sup> Guadalupe, Z.; Ayestarán, B., *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10720–10728.

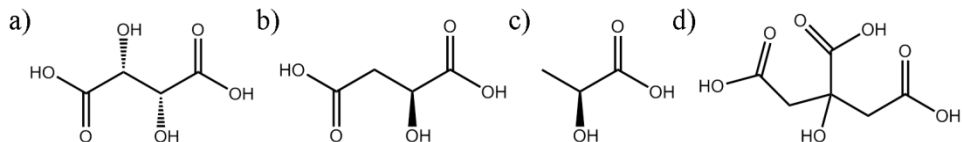
<sup>3</sup> Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Toribio, L.; Del Alamo, M., *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 507–511.

<sup>4</sup> Moreno-Arribas, M. V.; Polo, M. C. *Wine Chemistry and Biochemistry*; 1<sup>a</sup> Ed. Springer 2009.

<sup>5</sup> Ruiz-Matute, A. I.; Sanz, M. L.; Moreno-Arribas, M. V.; Martínez-Castro, I., *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7296–7300.

Los ácidos predominantes tanto en mosto como en vino son los ácidos: málico, láctico, cítrico, tartárico, succínico y acético; que entre otros hacen que el pH del vino esté comprendido entre 3.2 y 4.0.

El ácido tartárico (Figura 1.4 a) es el ácido más importante de la uva y del vino, y uno de los responsables del pH y de la sensación ácida en boca al poseer dos grupos ácidos en su estructura. Este ácido es utilizado para corregir el pH de los vinos a los valores óptimos de vinificación. En el vino puede estar presente con uno o con los dos grupos ácidos carboxílicos desprotonados (bitartrato y tartrato, respectivamente). Ambos compuestos forman sales combinados con el potasio y el calcio del medio. Además, tienen tendencia a precipitar en según qué condiciones. Por ello, para favorecer la estabilidad del vino, se fuerza su precipitación con un enfriamiento del mismo.



**Figura 1.4.** Molécula de los ácidos a) tartárico, b) málico, c) láctico y d) cítrico

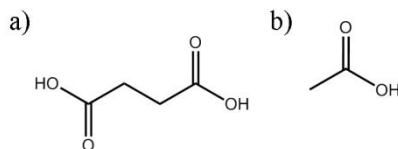
El ácido málico (Figura 1.4 b) está presente en la uva y por lo tanto, en el mosto. Su concentración varía en función de la variedad y de la temperatura de la zona de producción de la uva, siendo en zonas frías de 8 g/L y en zonas cálidas entre 1 y 2 g/L. En la Rioja los valores presentes en el tempranillo son de unos 3 g/L.

El ácido láctico (Figura 1.4 c) se genera a lo largo del proceso de elaboración del vino. Su biosíntesis principal tiene lugar durante la fermentación maloláctica, que se explica ampliamente en el apartado 1.4, aunque también se genera por vías paralelas a la fermentación alcohólica. Su contenido varía en función de la cantidad de ácido málico presente en el vino.

El ácido cítrico (Figura 1.4 d) está presente en la uva en niveles de 300 mg/L, pero cuando la uva está afectada por *Botrytis cinerea* o podredumbre gris, sus niveles se elevan a 1 g/L. También, este ácido es habitualmente empleado a la hora de corregir el pH de los vinos,<sup>6</sup> principalmente de los blancos. Al estar este ácido de manera natural en el vino, su adición no modifica excesivamente su perfil aromático ni gustativo. Esto hace que sea habitual percibir los tonos cítricos más agudizados en determinados vinos blancos.

El ácido succínico (Figura 1.5 a) es un subproducto de la fermentación alcohólica, por lo que está presente solo en el vino. Habitualmente es empleado para controlar la cinética de la fermentación, ya que refleja la velocidad de actuación de las levaduras.

Por otro lado, un exceso de ácido acético (Figura 1.5 b) nos lleva al picado acético. Este ácido es producido fundamentalmente por las bacterias aeróbicas del género *Acetobacter*. Se combina fácilmente con el etanol para dar acetato de etilo, produciendo el olor característico del vinagre. El límite legal para el contenido en ácido acético de vinos blancos y rosados es 1.50 g/L y para los tintos envejecidos 1.20 g/L.<sup>7</sup>

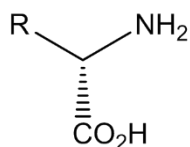


**Figura 1.5.** Moléculas de los ácidos a) succínico y b) acético.

<sup>6</sup> Zakharova, E. A.; Moskaleva, M. L.; Akeneev, Yu. A.; Moiseeva, E. S.; Slepchenko, G. B.; Pikula N. P. *J. Anal. Chem.* **2011**, *66*, 848–853

<sup>7</sup> Anexo 1, capítulo 5, artículo 16. Reglamento de la Denominación de Origen calificada "Rioja" y de su Consejo Regulador. <http://es.riojawine.com/es/36-legislacion.html>. (activa con fecha 6-2-2012)

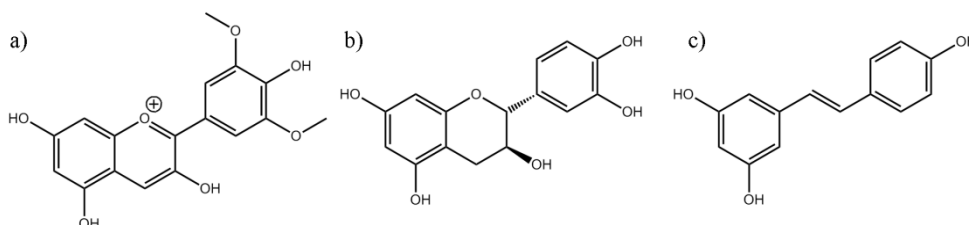
En el vino la materia nitrogenada está constituida fundamentalmente por el catión amonio y por los aminoácidos (Figura 1.6),<sup>8</sup> presentes en su forma libre o en cadenas polipeptídicas y proteínas. El catión amonio es la forma más fácilmente asimilable por las levaduras, aunque los aminoácidos, a excepción de la prolina, también pueden ser metabolizados por éstas.



**Figura 1.6.**  $\alpha$ -Aminoácido.

Cuando se habla de sustancias minerales contenidas en el vino o en el mosto se hace referencia al contenido de potasio, calcio, magnesio, sodio, silicio, fosfatos, sulfatos y cloruros.<sup>8</sup>

Los polifenoles (Figura 1.7) están presentes tanto en la uva como en el vino y son responsables del color rojo del vino tinto (antocianos como la malvidina) y de su amargor y astringencia (taninos como la catequina). También están presentes los ácidos fenólicos como el ácido gálico, los estilbenos como el resveratrol, puesto de moda por sus supuestos efectos sobre la salud humana, y los flavonoles y dihidroflavonoles como la astilbina, responsable de color amarillo del hollejo de la uva blanca.



**Figura 1.7.** Polifenoles a) antociano malvidina; b) tanino catequina y c) estilbeno *trans*-resveratrol.

<sup>8</sup> Bell, S. J.; Henschke, P. A. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242–295.

### 1.3. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es el proceso de transformación química que tiene lugar en el mosto debido a la acción de las levaduras. Estos microorganismos proceden del exterior de la uva y utilizan los hidratos de carbono como la glucosa y la fructosa para la formación del etanol y dióxido de carbono.

#### 1.3.1. Bioquímica del proceso

La levadura responsable de este proceso es la *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 1.8 a). Inicialmente están presentes en cantidades del orden de  $10^4$  unidades formadoras de colonias (UFC),<sup>9</sup> pero gracias al consumo de la materia nitrogenada generan la energía suficiente para multiplicarse (Figura 1.8 b) y alcanzar los valores óptimos para realizar la fermentación alcohólica. Al final de la misma, debido principalmente al alto contenido en etanol que les resulta tóxico, entran en la fase de mortandad aportando sus lías. Las lías son parte de las estructuras que conforman la levadura, que al morir y descomponerse se segregan al medio.<sup>10</sup>

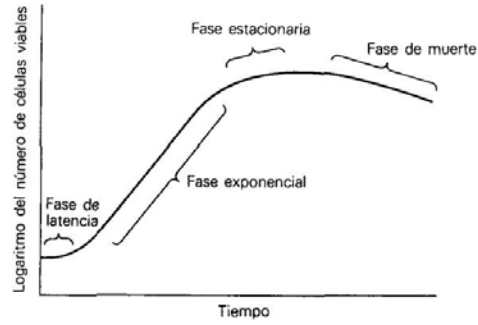
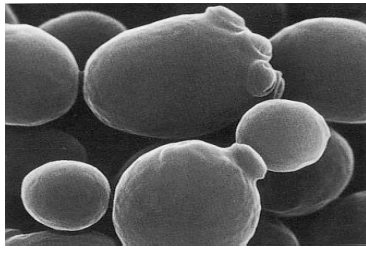
Generalmente la fermentación alcohólica comienza espontáneamente pero actualmente se usan preparados liofilizados, levaduras secas activas (LSA),<sup>11</sup> para controlar los subproductos de cepas de levaduras no recomendadas para la obtención de un buen vino.

---

<sup>9</sup> Boulton, R. B., *Teoría y práctica de la elaboración del vino*. Acribia. 2003.

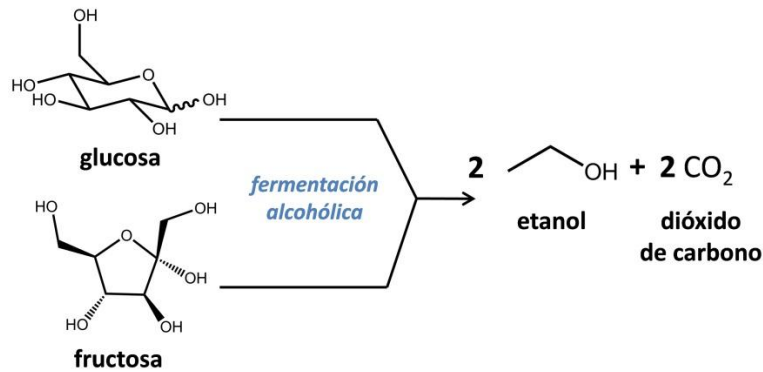
<sup>10</sup> Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. *Handbook of Enology Volume 1 y 2; 2<sup>nd</sup> Ed.*, John Wiley and Sons, Ltd, 2006.

<sup>11</sup> Hidalgo Togores, J. *Tratado de Enología*. Mundi-prensa. 2003.



**Figura 1.8.** a) Levaduras *Saccharomyces cerevisiae* b) Curva de crecimiento de la población de levaduras expresado en días.

Durante la fermentación alcohólica tienen lugar muchas rutas metabólicas en el interior de las levaduras, aunque la principal es la de formación de etanol a partir de los azúcares, cuya expresión teórica aparece en la Figura 1.9.



**Figura 1.9.** Ecuación teórica de la fermentación alcohólica.

Por cada molécula de azúcar (glucosa o fructosa) consumida se generan dos de etanol y dos de dióxido de carbono. Pero en el caso del vino esta reacción no es pura, y no todas las moléculas de azúcar siguen esta ruta, ya que sufren la degradación en la ruta glicéropirúvica (Figura 1.10).<sup>12</sup>

<sup>12</sup> Usseglio-Tomasset, L. *Química Enológica*; 4ªEd. Mundi-prensa 1998.

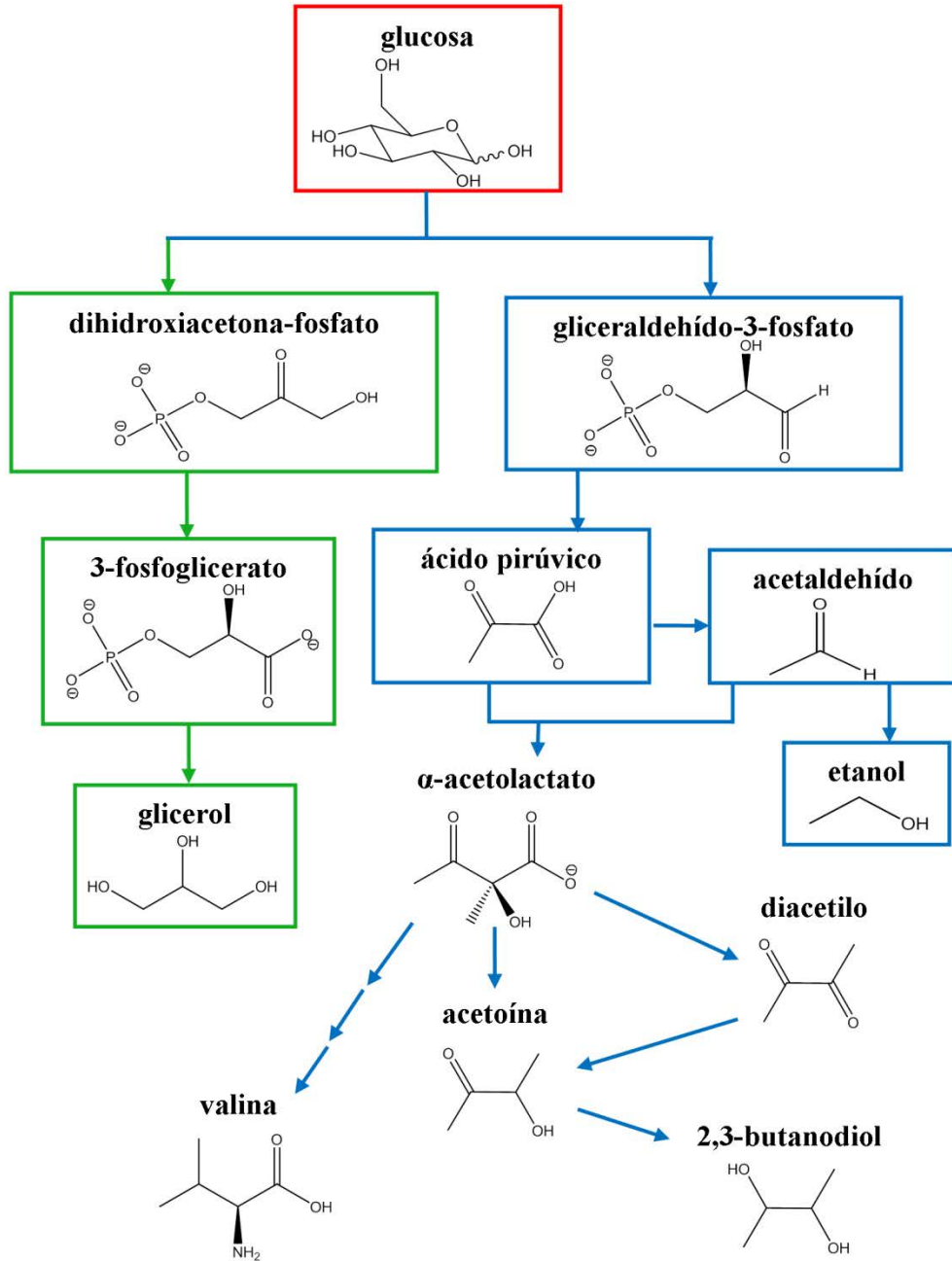


Figura 1.10. Esquema de reacción. Verde, ruta gliceropirúvica. Azul, fermentación alcohólica y subproductos.

En el interior de la levadura, la glucosa sufre el proceso de la glucólisis generando ácido pirúvico (Figura 1.11). Este compuesto es el precursor de numerosas rutas secundarias, cuyas reacciones intermedias están acopladas debido al mecanismo de oxidación-reducción por la acción de NADH<sub>2</sub> (nicotinamida adenin dinucleótido), un buen agente reductor.<sup>13</sup> La fermentación gliceropirúvica tiene lugar al inicio de la glucólisis, que al no existir acetaldehído suficiente en el medio, toma otra vía generando glicerol<sup>9</sup> y acumulando ácido pirúvico. Éste a su vez genera nuevos productos secundarios como son los ácidos láctico, acético, butírico, succínico y el alcohol 2,3-butanodiol (Figura 1.12).<sup>10</sup>

Desde el punto de vista energético, la fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, ya que por cada molécula de glucosa consumida se generan 40 Kcal. La levadura utiliza 14.6 Kcal para asegurar sus funciones vitales y el resto, 25.4 Kcal, es liberado en forma de calor al medio de fermentación,<sup>14</sup> de modo que es necesario enfriar para que la temperatura del vino no suba demasiado.

Durante la fermentación alcohólica también se consume ácido málico por la acción de las levaduras. Según la especie, se puede observar una pérdida entre 10-25% de la cantidad inicial. Esta degradación, denominada fermentación maloalcohólica (Figura 1.13), ocurre principalmente a pH bajos y se anula a pH 5. Sin embargo, esta actividad secundaria de las levaduras sólo tiene lugar conjuntamente con la fermentación alcohólica.<sup>10, 12</sup>

---

<sup>13</sup> Nelson, L. D.; Cox, M. M. *Lehninger Principios de Bioquímica*; 3ª Ed. 2001.

<sup>14</sup> Moreno, J. J.; Peinado, R. A. *Química enológica*, 1ª Ed. 2010.



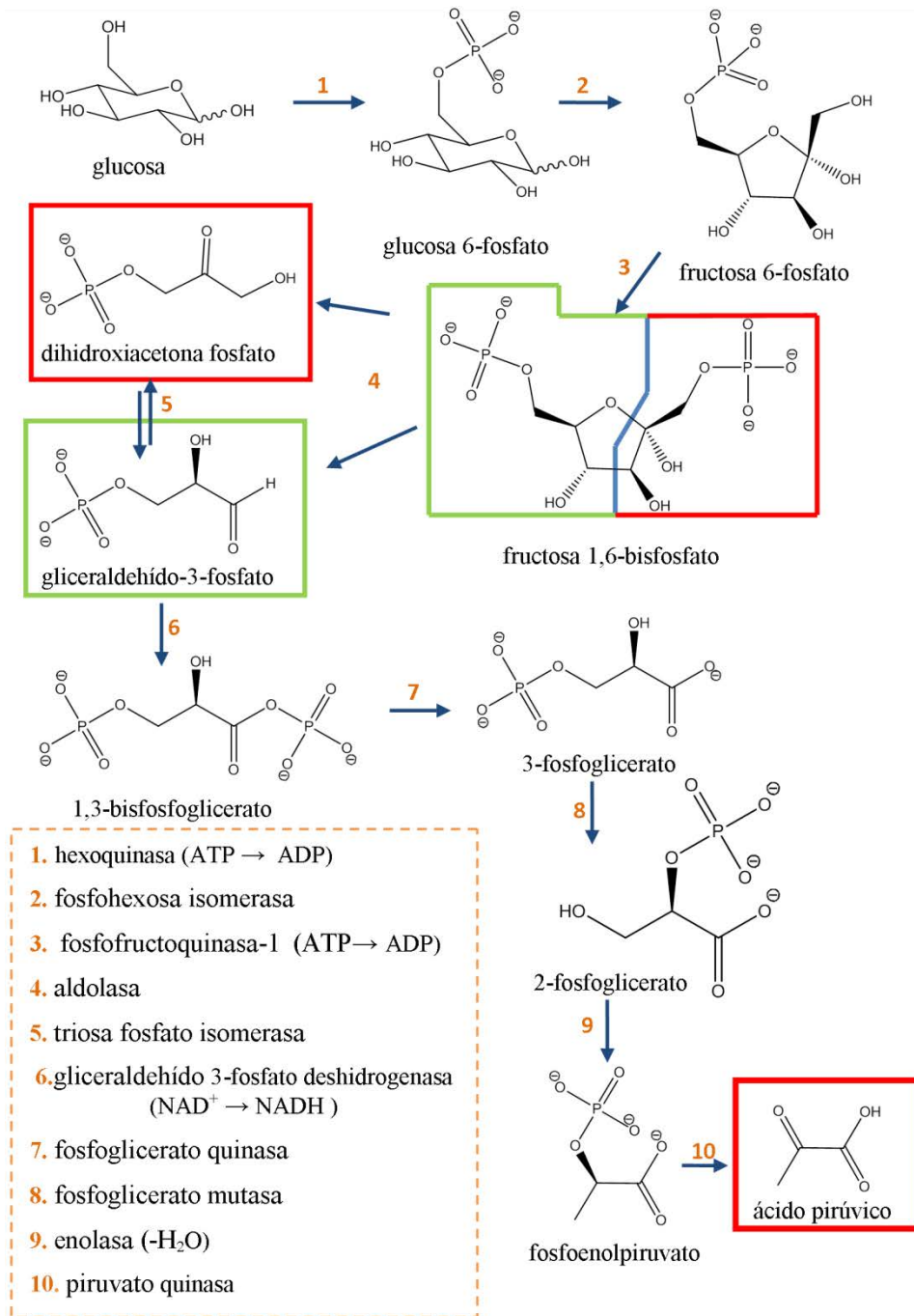
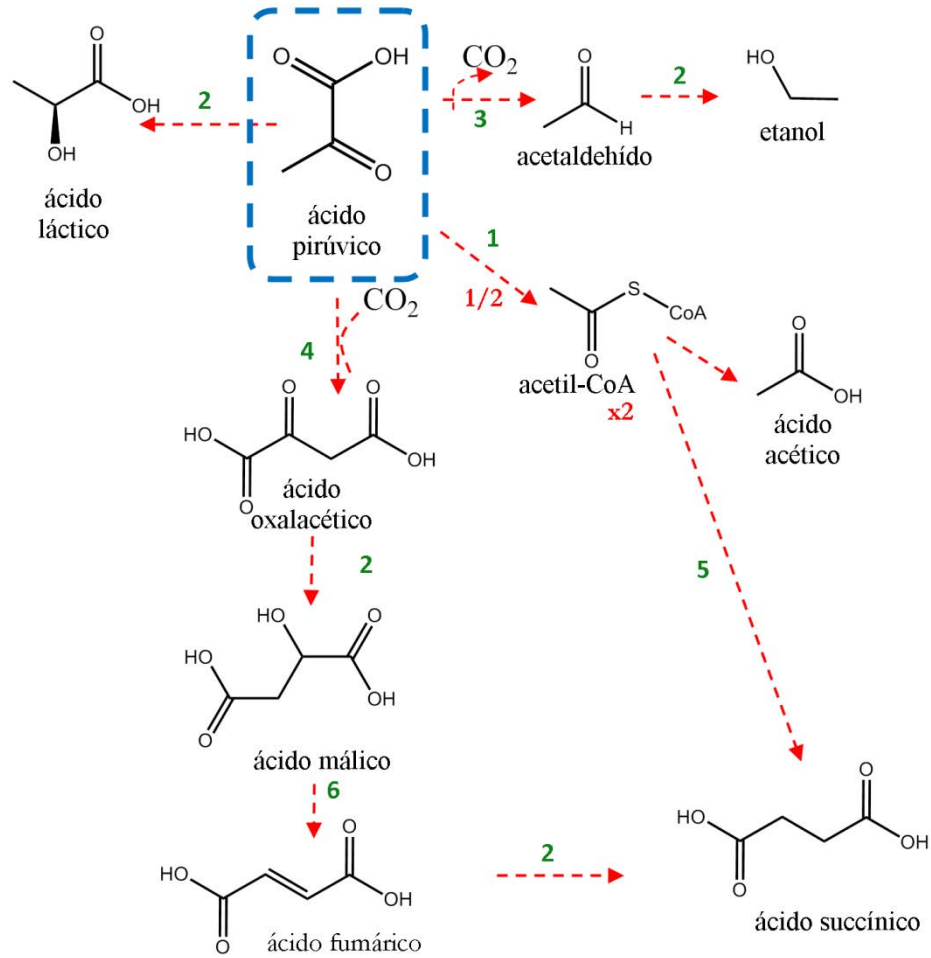
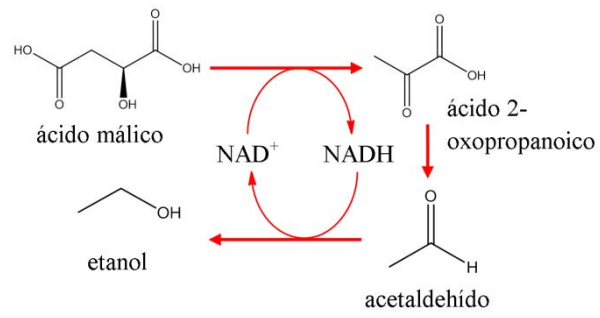


Figura 1.11. Esquema de la glucólisis.



**Figura 1.12.** Esquema de reacción de la fermentación alcohólica y subproductos.  
**1.** Oxidación NAD<sup>+</sup> → NADH **2.** Reducción NADH → NAD<sup>+</sup>; **3.** Descarboxilación  
**4.** Reacción Wood-Werkman (+CO<sub>2</sub>) **5.** Reacción Thunberg; **6.** Fumarasa.



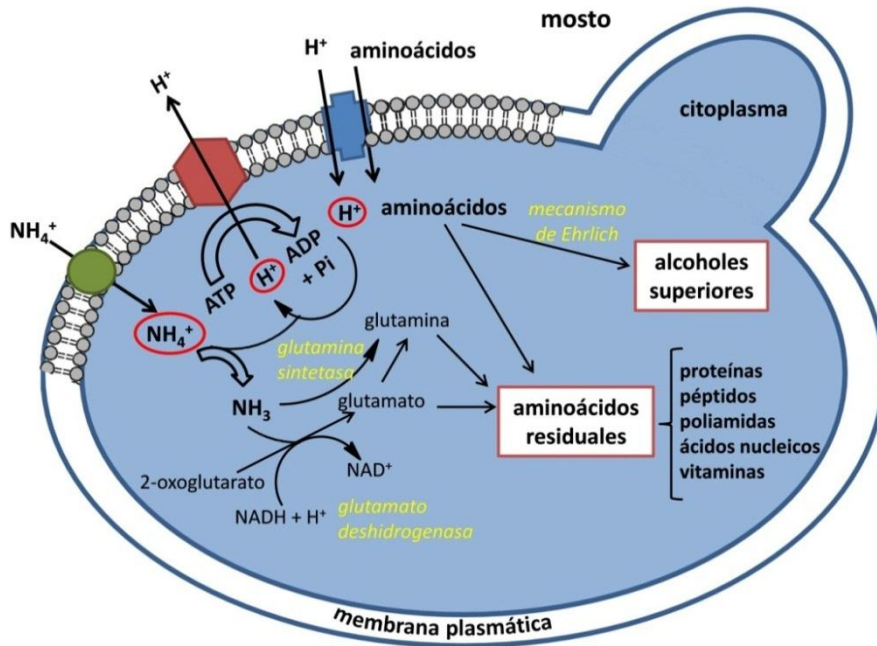
**Figura 1.13.** Esquema de la fermentación maloalcohólica.

### 1.3.2. *Materia nitrogenada*

La materia nitrogenada consumida por las levaduras está formada principalmente por amonio y aminoácidos. Las levaduras, inicialmente consumen sólo amonio, pero una vez acabado comienzan con los aminoácidos, a excepción del aminoácido prolina, que sólo es metabolizado por las levaduras bajo condiciones aeróbicas. Por esta razón se conoce como nitrógeno fácilmente asimilable (FAN) al conjunto formado por el amonio y los aminoácidos presentes en el mosto, salvo la prolina (Figura 1.14).

El contenido de nitrógeno fácilmente asimilable es muy importante. Con valores inferiores a 130 mg/L de nitrógeno existe un alto riesgo de que el desarrollo de la fermentación alcohólica no sea el adecuado, pudiendo llegar a pararse, proliferando así las bacterias acéticas y llegando a avinagrar el vino.<sup>8,14</sup> También el bajo contenido en amonio y aminoácidos no azufrados, como alanina, serina, leucina, arginina, isoleucina entre otros, puede provocar el consumo de aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina, que como subproducto generan ácido sulfhídrico y mercaptanos.<sup>8</sup> Estos últimos aportan al vino aromas bastante intensos a reducción disminuyendo la calidad del mismo.

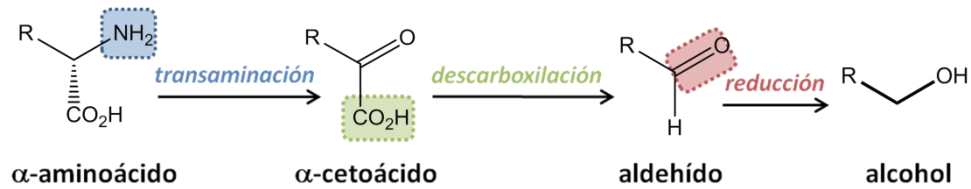
Con el fin de evitar estas consecuencias, desde el comienzo de los años 90 se comenzó a adicionar a los mostos suplementos de sales amónicas y aminoácidos. Pero una cantidad excesiva de materia nitrogenada provoca un mayor contenido de aminoácidos residuales, que aportan inestabilidad microbiológica al vino e incluso ayudan a la producción de aminas biógenas durante la fermentación maloláctica. Debido a estas razones es necesario conocer cómo evoluciona la materia nitrogenada a lo largo del proceso de vinificación y así poder evaluar más adecuadamente cómo actuar con el mosto.



**Figura 1.14.** Mecanismos de asimilación del nitrógeno en la levadura.

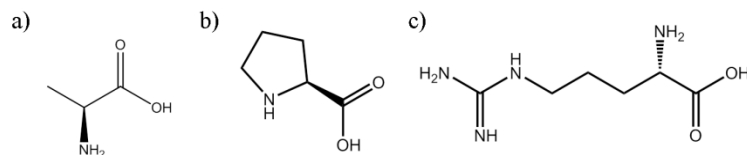
Se han detectado alrededor de 20 aminoácidos en el mosto, que representa entre el 30 y el 40% de contenido total de nitrógeno, en función de si es uva blanca o tinta. Su contenido aumenta durante la maduración de la uva hasta alcanzar el 70% del nitrógeno orgánico en el momento de la vendimia.<sup>8,12</sup> El contenido de aminoácidos en el mosto es muy importante no sólo para las levaduras, sino también para las características organolépticas del vino final (Figura 1.14). Los aminoácidos en el interior de la levadura son asimilados de varias maneras, pero la vía principal es el mecanismo de Ehrlich (Figura 1.15).<sup>10</sup> A través de este proceso los aminoácidos son transformados en alcoholes superiores o fusel. Los alcoholes superiores, así como sus ésteres, son compuestos muy aromáticos que influyen, en cantidades adecuadas, positivamente en el perfil aromático de un vino. Por ejemplo, a partir de la fenilalanina se obtiene feniletanol, responsable del aroma a rosas.

Por otro lado, las levaduras, una vez realizada su función, pueden aportar al medio aminoácidos procedentes de su autólisis y evidentemente variando las concentraciones iniciales.<sup>8</sup> También se pueden formar mediante rutas metabólicas a partir del ácido glutámico o de diversos cetoácidos en el interior de las levaduras.<sup>10</sup>

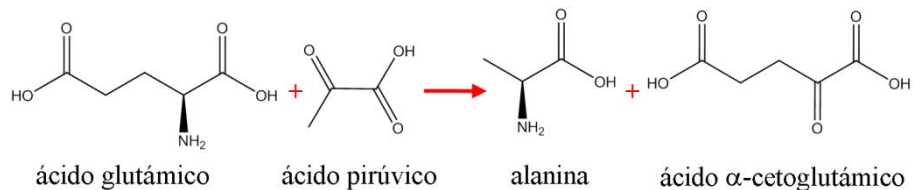


**Figura 1.15.** Mecanismo de asimilación de nitrógeno de Ehrlich.

El contenido de aminoácidos en el mosto es variable<sup>15</sup> según las variedades de uva empleadas, pero en la mayoría predominan prolina y arginina.<sup>12</sup> La alanina (Figura 1.16 a) no suele estar presente en el mosto, excepto en la variedad tempranillo. Por el contrario, está presente en el vino elaborado a partir de cualquier variedad, debido a su formación durante la fermentación alcohólica dentro de la levadura (Figura 1.17).



**Figura 1.16.** Estructura de **a)** L-alanina, **b)** L-prolina y **c)** L-arginina.



**Figura 1.17.** Biosíntesis de la alanina durante la fermentación alcohólica.

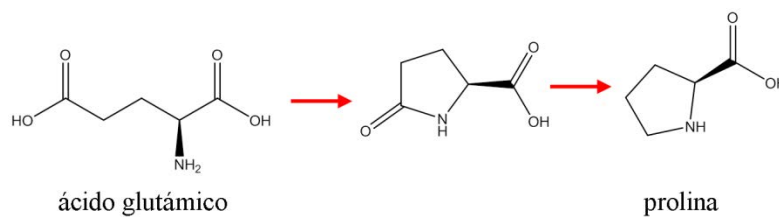
<sup>15</sup> Hernández-Orte, P.; Ibarz, M.J.; Cacho, J.; Ferreira, V. *J. Food Chem.* **2006**, 98, 300–310.

La prolina (Figura 1.16 b), debido a su estructura en la que la amina es secundaria y no primaria como en el resto de los aminoácidos, es raramente consumida por las levaduras, salvo cuando no existe nitrógeno suficiente para su multiplicación. En cambio, el resto de los aminoácidos son rápidamente consumidos por las levaduras. Dentro de esta introducción es necesario resaltar los resultados diferentes obtenidos por varios investigadores.

Bell y sus colaboradores presentan a la arginina (Figura 1.16 c) como un aminoácido representativo por su rápida metabolización por las levaduras frente a la prolina como aminoácido no consumible. De esta manera, estudian cómo varía la relación prolina/arginina para poder conocer el consumo de los aminoácidos.<sup>8</sup> En cambio, Cacho y sus colaboradores en sus investigaciones encuentran que la arginina no se consume totalmente, llegando a permanecer en un 10% de la concentración total.<sup>15</sup> Parece que frente a esta controversia se presenta un tema importante de estudio.

También, varios autores han descrito que estos dos aminoácidos pueden utilizarse como indicadores de madurez al reflejar el valor nutricional del mosto.<sup>10,15</sup>

La prolina es un aminoácido que no sólo no se consume, sino que al formarse a partir de otros aminoácidos e intermedios de reacción aumenta su contenido en el vino con respecto al del mosto (Figura 1.18).<sup>14,15</sup>

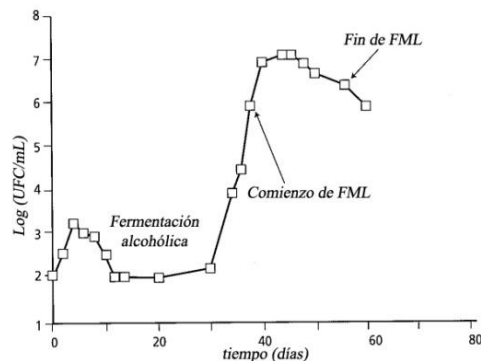


**Figura 1.18.** Síntesis de la prolina durante la fermentación alcohólica.

### 1.4. Fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica es el proceso que tiene lugar en el vino, principalmente en el tinto, por el cual las bacterias lácticas transforman el ácido málico a ácido láctico. Con ella se provocan cambios organolépticos en algunos vinos, debido a la disminución de la acidez al pasar del ácido málico (dos grupos carboxilo) a otro más débil como el ácido láctico (un grupo carboxilo). Además, el ácido málico posee tonos herbáceos que pueden aportar al vino tinto sabores poco agradables.

Este proceso es realizado por las bacterias lácticas, principalmente por *Oenococcus oeni* (Figura 1.19 a).<sup>10</sup> Esta especie es capaz de sobrevivir y transformar el ácido málico en las condiciones del vino, con pH a veces menor del 3.5, alto contenido de etanol (>10° v/v) y altos niveles de sulfuroso (50 mg/L). Las bacterias evolucionan de modo diferente a las levaduras. En un primer momento aumentan su población junto con las levaduras, pero cuando comienza la fermentación alcohólica éstas entran en fase de latencia. Al final de ésta, comienza su crecimiento exponencial y una vez que alcanzan los valores óptimos ( $10^6$  UFC) comienza la fermentación maloláctica (Figura 1.19 b).<sup>9,10</sup>



**Figura 1.19.** a) Bacterias lácticas *Oenococcus oeni*. b) Curva de crecimiento de bacterias lácticas.

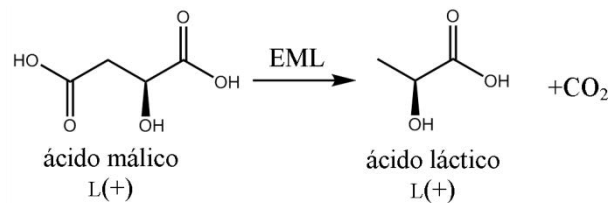


Este proceso es endotérmico y a diferencia de la fermentación alcohólica no es necesario aplicar frío para su control. En cambio, suele requerir aplicar calor debido a que la temperatura óptima de las bacterias es mayor y con temperaturas bajas (15° C) puede tener lugar una parada de fermentación.<sup>16</sup> Aunque no es un proceso favorecido térmicamente, como en el caso de la fermentación alcohólica, sí provoca un aumento del pH del interior de la célula que da lugar a un flujo de protones. Este flujo permite la formación del adenin trifosfato (ATP).<sup>14</sup>

Varios autores han descrito diferentes mecanismos llevados a cabo por las enzimas de las bacterias para la transformación del ácido málico. Según las condiciones del medio podrán actuar determinadas bacterias u otros microorganismos y se obtendrán un enantiómero u otro del ácido láctico.<sup>14</sup> Alizade y Simon en 1973 estudiaron la química de esta transformación. Emplearon tanto metodología enzimática, para determinar las cantidades específicas de los esteroisómeros, como el uso de glucosa y ácido málico marcados radiactivamente en la realización de un vino con el fin de estudiar sus productos.<sup>10</sup>

Los mecanismos propuestos son tres:

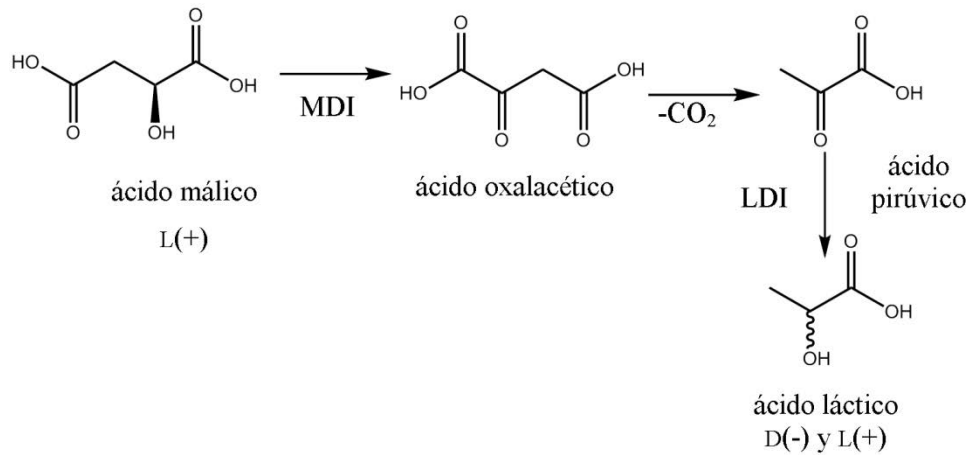
- **Mecanismo 1.** La enzima maloláctica (EML) lleva a cabo la transformación pero se desconoce el mecanismo. Se sabe que sólo genera ácido láctico L(+).



**Figura 1.20.** Mecanismo 1 de la transformación del ácido málico.

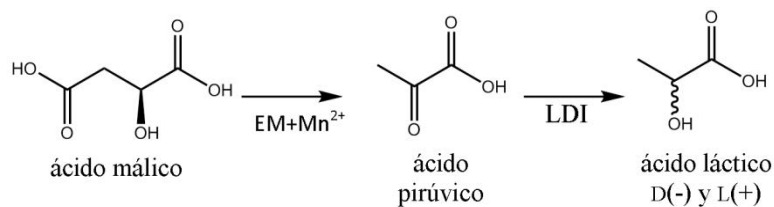
<sup>16</sup> Peynoud, E.; Blouin, J. *Enología práctica. Conocimientos y elaboración del vino*. 4ª Ed. Mundi-prensa. 2004.

- **Mecanismo 2.** La transformación es llevada a cabo gracias a la presencia de la enzima málico deshidrogenasa (MDI) y a la existencia de dos láctico deshidrogenasas, dextro (D(-)LDI) y levógira (L(+))LDI). De este modo, se obtiene una mezcla racémica del ácido láctico.



**Figura 1.21.** Mecanismo 2 de la transformación del ácido málico.

- **Mecanismo 3.** A un pH próximo a 8.5 actúa la enzima málico (EM), además de las láctico deshidrogenasa (D(-)LDI y L(+))LDI, obteniéndose de este modo una mezcla racémica del ácido láctico.



**Figura 1.22.** Mecanismo 3 de la transformación del ácido málico.

Las bacterias heterofermentativas (glucosa es fermentada a ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético y etanol)<sup>4</sup> y más concretamente las *Oenococcus* forman exclusivamente el ácido láctico dextrógiro (-) a partir del metabolismo de la

glucosa, y el ácido láctico levógiro (+) a partir del ácido málico levógiro (+). Por lo tanto, el mecanismo principal que lleva a cabo la fermentación maloláctica sólo puede ser el mecanismo 1, al obtenerse ácido láctico levógiro (+) gracias a la enzima maloláctica, mediante una descarboxilación directa.<sup>10,14</sup> Los otros mecanismos de obtención de ácido láctico a partir del ácido málico serán llevados a cabo por microorganismos distintos a las bacterias lácticas; así que sólo se hablará del mecanismo 1 cuando se trate de la fermentación maloláctica.

Además de transformar el ácido málico, las bacterias lácticas también metabolizan otros ácidos, como los ácidos cítrico (Figura 1.23) y tartárico (Figura 1.24).<sup>14</sup> En el primer caso, la bacteria transforma el ácido cítrico en varios compuestos como son: ácido láctico, etanol, diacetilo y 2,3-butanodiol, lípidos y ácido acético. En función del medio puede verse favorecida la síntesis de alguno más que del resto, como es el caso del ácido acético, que con bajo contenido de glucosa y un pH bajo se favorece su formación (Figura 1.23). En el segundo, el ácido tartárico es transformado por la bacteria láctica en ácido succínico, ácido acético y ácido láctico (Figura 1.24).

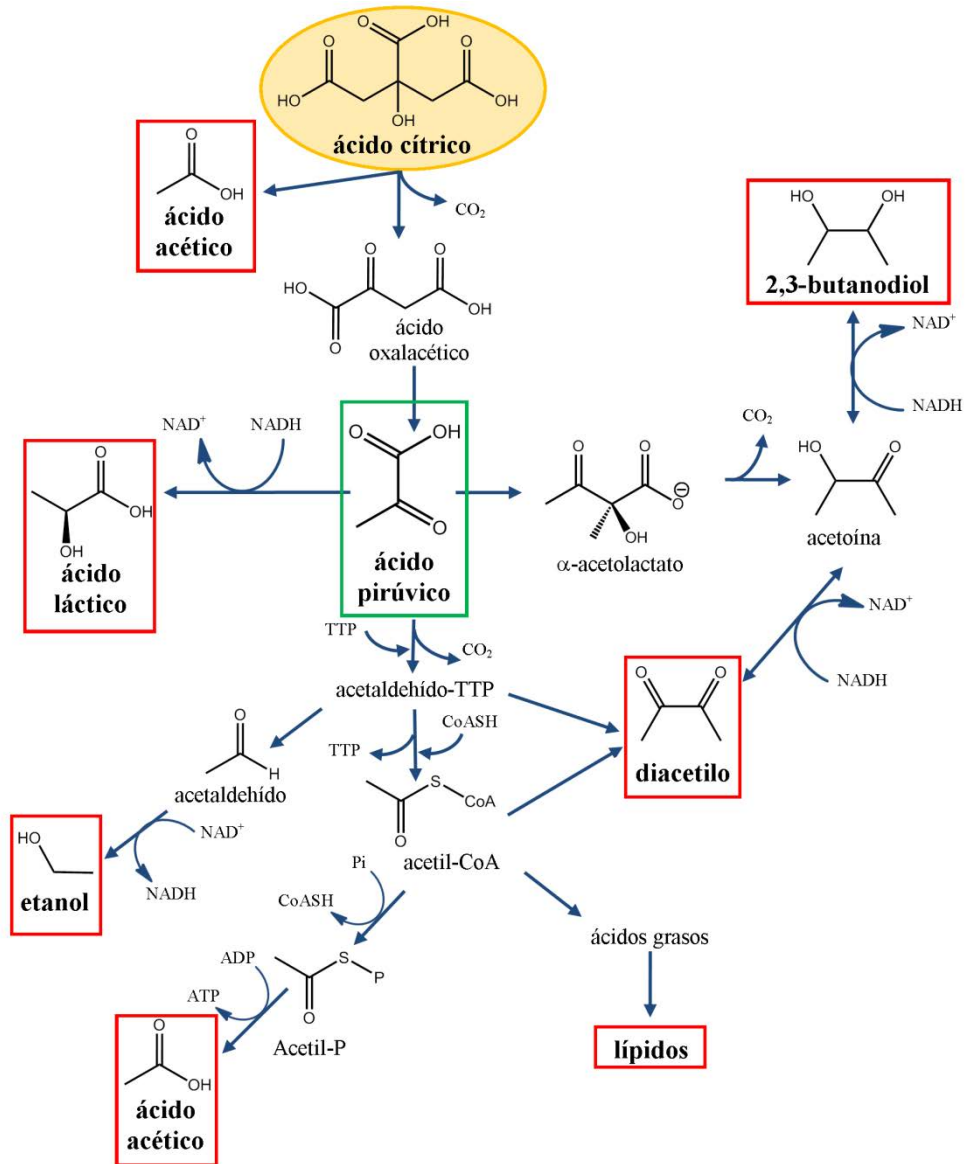
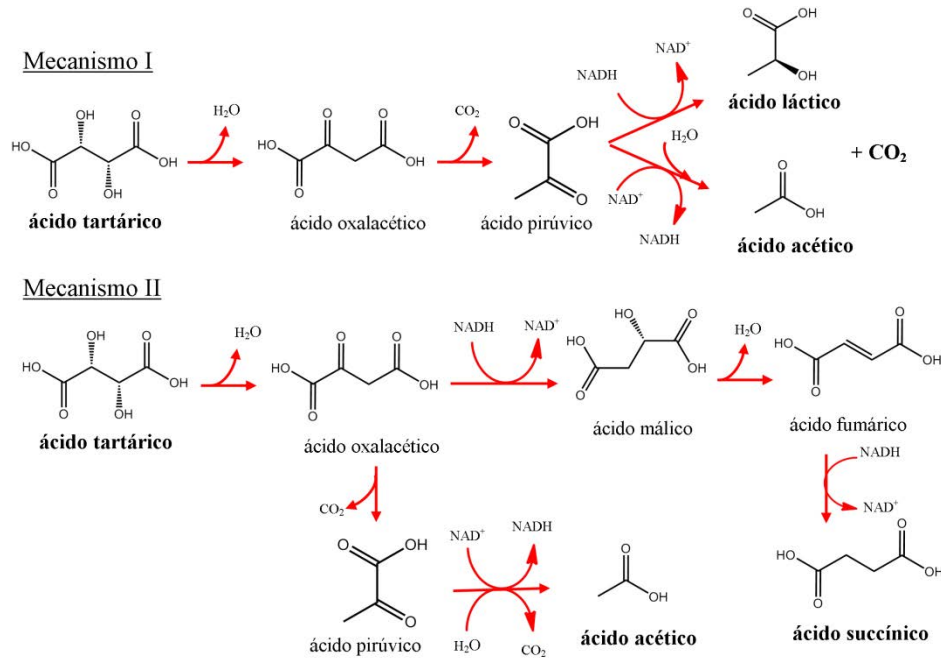


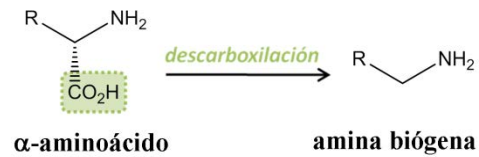
Figura 1.23. Ruta metabólica de la degradación del ácido cítrico.



**Figura 1.24.** Ruta metabólica de la degradación del ácido tartárico.

En ambos casos, tanto en la degradación del ácido cítrico como la del tartárico, se produce un aumento de la acidez volátil debido a la formación del ácido acético.

Las bacterias lácticas también descarboxilan los aminoácidos presentes en el vino formando aminas biógenas (Figura 1.25), cuya toxicidad es conocida. Un alto contenido de éstas es motivo de prohibición en mercados internacionales como el americano. Generalmente, los aminoácidos que sufren dicha transformación son la histidina que genera histamina, la tirosina que da tiramina, la lisina que da la cadavarina y la fenilalanina que da feniletilamina. También se generan por otro camino la putrescina a partir de la arginina a través de la formación de ornitina.<sup>10</sup>



**Figura 1.25.** Esquema de formación de las aminas biógenas.

La fermentación maloláctica, a diferencia de la alcohólica, es un proceso prescindible; no todos los vinos la realizan, aunque en un vino tinto es muy normal que sí lo haga, pero siempre por decisión del enólogo. Generalmente, comienza de modo espontáneo, pero actualmente comienza a ser frecuente el empleo de preparados de bacterias liofilizadas que aseguran el empleo de una cepa de bacteria adecuada para obtener un buen vino.

## 1.5. Crianza en barrica

Una vez acabadas las fermentaciones alcohólica y maloláctica, el vino resultante puede ser embotellado para su consumo como vino joven o puede ser enfocado a una evolución en su composición. Se entiende como crianza el proceso por el cual el vino se dirige a una evolución físico-química natural, en recipientes que contribuyen al proceso, aportando componentes propios. Suele ser habitual el empleo como recipiente una barrica de roble de 225 litros (Figura 1.26).

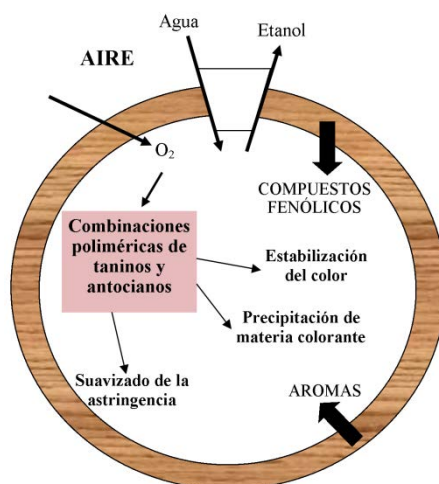


**Figura 1.26.** Barrica de roble de 225 litros.

En la barrica de roble el vino está en una atmósfera oxidante debido a la porosidad de la madera. En ella tienen lugar reacciones entre los compuestos presentes en la madera y los compuestos del vino, sin intervención de microorganismos pero en presencia de oxígeno. Por ello, es muy importante no sólo el tipo de roble (francés, americano...), sino también el tipo de tostado (ligero, medio, fuerte y muy fuerte) y la edad de la barrica.

Gran parte de las moléculas que se incorporan al vino y que presentan gran interés para su calidad, se producen o se degradan durante el proceso de tostado de las duelas (láminas de madera de roble que conforman la barrica). Pero estos compuestos se van consumiendo y con los años la barrica cada vez es más pobre. Además, también pierde porosidad al obturarse por la precipitación paulatina del vino, lo que disminuye poco a poco su capacidad de oxigenación. Por lo tanto, se puede decir que la vida de una barrica no es muy elevada y a partir de los cinco años el aporte tanto de oxígeno ( $<0.2$  mg de oxígeno/L), como de los compuestos es mínimo.

La presencia del oxígeno en el vino produce la oxidación de los alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas, además de favorecer las combinaciones poliméricas de taninos y antocianos. Este último hecho provoca la estabilización del color, la precipitación de la materia colorante y un suavizado en la astringencia de los vinos (Figura 1.27).



**Figura 1.27.** Influencia de la crianza en barrica sobre la evolución del vino tinto.

El mayor aporte de compuestos de la barrica al vino procede de la lignina de la madera, bien por su hidrólisis con el etanol o por su tostado. Pero también la madera aporta taninos hidrolizables y condensados, polisacáridos, y lactonas. Estas últimas se producen en el proceso del tostado y provienen de los lípidos presentes en la madera (Figura 1.28).<sup>17</sup>

Con la crianza del vino en barrica se pretende conseguir una transformación en el mismo, ganando en complejidad y estabilidad, con el fin de obtener un vino que perdure su calidad con los años.

<sup>17</sup> Zamora F. Elaboración y Crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos, Mundi-Prensa, 2003.



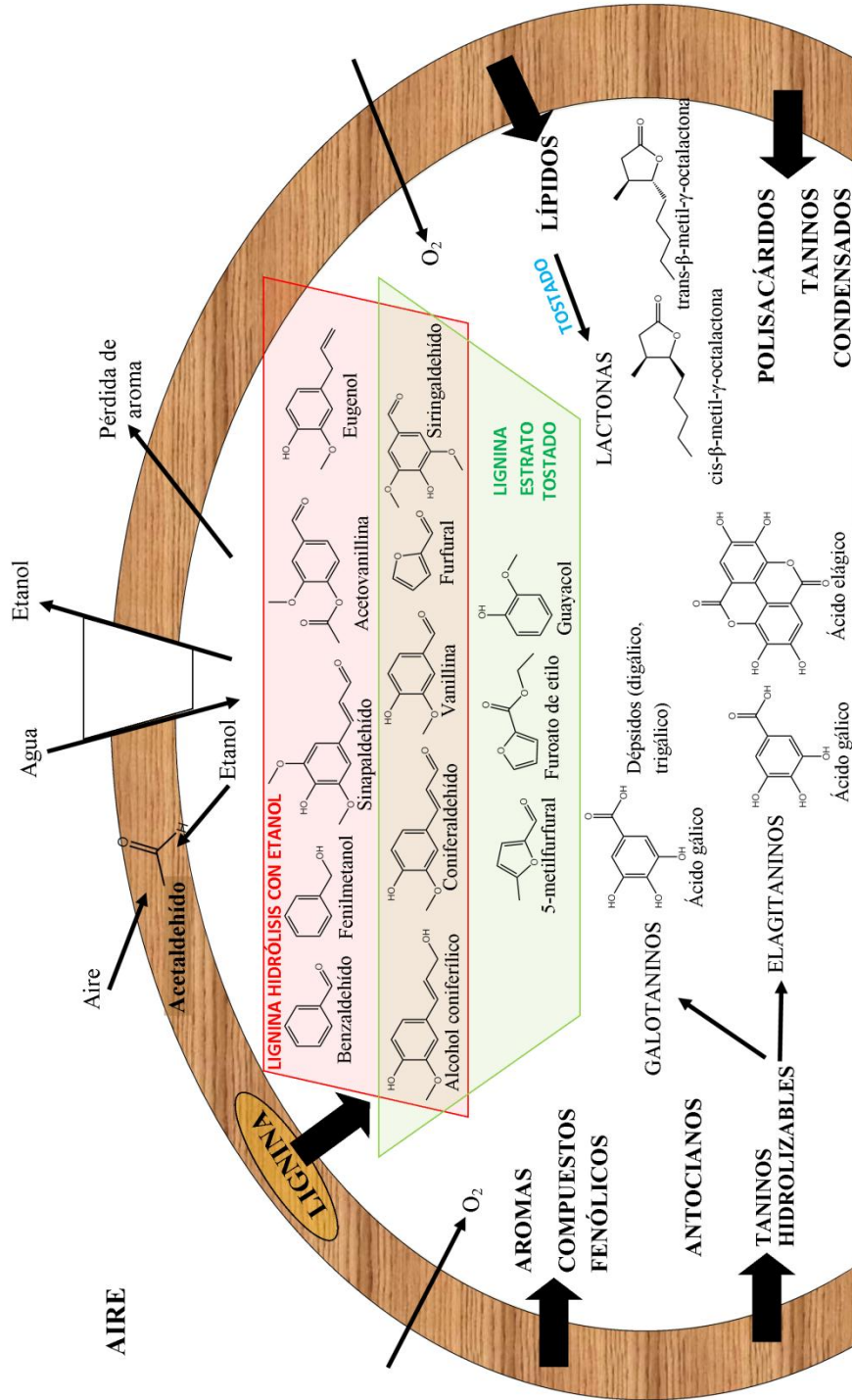


Figura 1.28. Esquema de las interacciones entre la madera de la barrica y el vino.





## **Capítulo 2**

### **Antecedentes y objetivos**

**2.1.** Historia de la resonancia magnética nuclear

**2.2.** Aplicaciones de la resonancia magnética nuclear

**2.3.** Objetivos



*“You know, what these people do is really very clever.*

*They put little spies into the molecules and*

*send radio signals to them, and they*

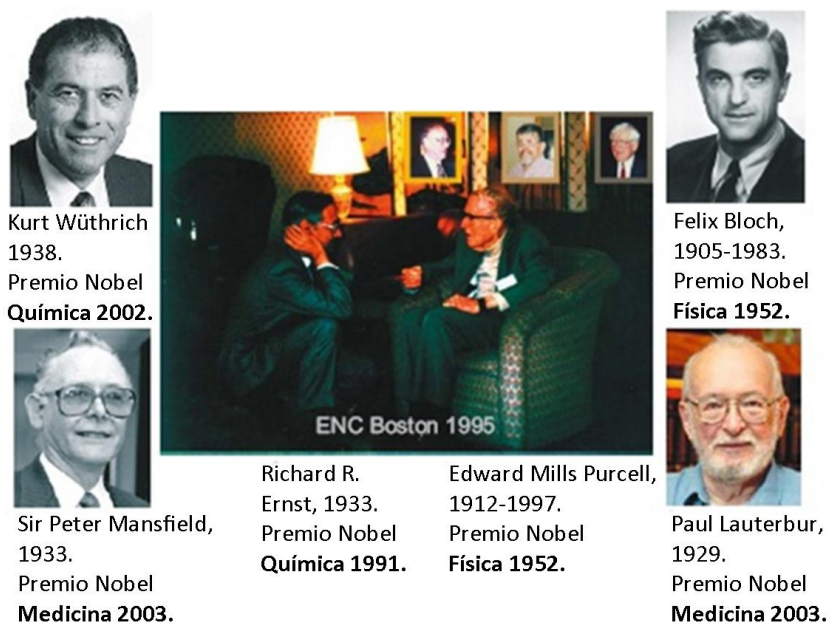
*have to radio back what they are seeing”*

Niels Bohr



## 2.1. Historia de la resonancia magnética nuclear

La técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se considera la herramienta más importante de la que dispone un químico para elucidar estructuras de compuestos en disolución. La RMN es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de los núcleos y desde 1943 ha estado ligada a los premios Nobel de Física, Química y Medicina. Otto Stern en 1943, Isidor I. Rabi en 1944 y Felix Bloch y Edward M. Purcell en 1952 recibieron el Premio Nobel de Física por sus trabajos en el desarrollo de la RMN (Figura 2.1). Esta técnica se posicionó como una de las más potentes desde el descubrimiento del desplazamiento químico y el acoplamiento escalar spin-spin (1949-51).



**Figura 2.1.** Premios Nobel otorgados a científicos por sus investigaciones en RMN.

Los primeros equipos de RMN eran de onda continua y fueron comercializados para el estudio del protón a comienzos de los años 50. Pero fue el desarrollo de la transformada de Fourier, herramienta matemática que permite el paso de una onda dependiente del tiempo a un espectro de señales en función de su frecuencia, lo que favoreció un incremento en la sensibilidad a finales de los años 60, que hizo posible su utilización con otros núcleos como el isótopo de carbono-13.

A lo largo de los años 70 y 80 se comenzó el estudio de técnicas multipulsos y de la RMN bidimensional, estando sus avances asociados a los estudios de Richard R. Ernst, que en 1991 recibiría por ellos el premio Nobel en Química. Kurt Wüthrich recibió en 2002 el Premio Nobel de Química por su contribución al estudio de la estructura tridimensional de biomoléculas mediante RMN. Paul C. Lauterbur y Peter Mansfield en 2003 recibieron el Premio Nobel en Medicina, por sus contribuciones al desarrollo de diferentes aplicaciones de la RMN.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Blümich, B. *Essential NMR for Scientists and Engineers*. Springer, 2005.



## 2.2. Aplicaciones de la resonancia magnética nuclear

Desde su descubrimiento, la RMN siempre ha estado ligada a elucidación de estructuras en disolución, primero únicamente en el estudio de los protones y después ampliándose a más núcleos. Por ello, esta técnica era anteriormente casi exclusiva de los químicos sintéticos. Sin embargo, con el desarrollo tanto de imanes y materiales superconductores como de la informática, se consiguió ampliar su campo de aplicación hasta ser una de las técnicas más versátiles que posee un químico.

En la actualidad es habitual encontrar en revistas de investigación muy diversas estudios en los que se utiliza la RMN como herramienta tanto de análisis estructural como analítico. La RMN está presente tanto en la ingeniería para el estudio de nuevos materiales,<sup>2,3</sup> como en la física y en la astronomía, utilizada para el análisis de materia orgánica tomada del espacio.<sup>4</sup>

La RMN es utilizada en la bioquímica y biología molecular para el estudio de diferentes funciones vitales de las células como las membranas plasmáticas,<sup>5</sup> la determinación estructural del ARN<sup>6,7</sup> o los empaquetamientos del genoma.<sup>8</sup>

En el campo farmacológico y toxicológico, la RMN era empleada tradicionalmente para el análisis estructural en la síntesis de fármacos. Ahora, también es empleada para el estudio de la actividad de los mismos a la hora de

---

<sup>2</sup> Ekanayake, P.; Dissanayake, M. A. K. L. *J. Solid State Electrochem.* **2009**, *13*, 1825–1829.

<sup>3</sup> Shapiro, Y. E. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1184–1253.

<sup>4</sup> Cataldo, F.; Keheyan, Y.; Heymann, D. *Origins Life Evol. B.* **2004**, *34*, 13–24.

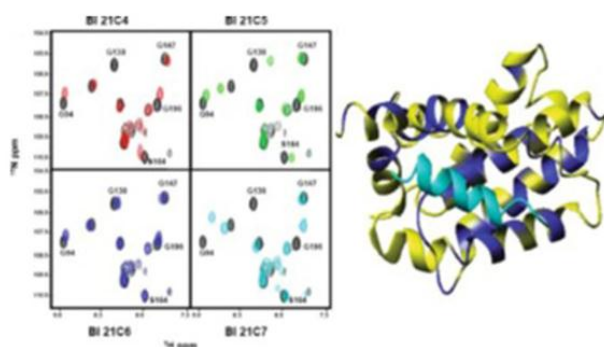
<sup>5</sup> Hellmich, U. A.; Glaubitz, C. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 815–834.

<sup>6</sup> Wang, Y.-X.; Zuo, X.; Wang, J.; Yu, P.; Butcher, S. E. *Methods* **2010**, *52*, 180–191.

<sup>7</sup> Patching, S. G. *Mol. Membr. Biol.* **2011**, *28*, 370–397.

<sup>8</sup> Lu, K.; Heng, X.; Summers, M. F. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 609–633.

diseñar un nuevo fármaco<sup>9</sup> y para la cuantificación mediante la resonancia magnética nuclear cuantitativa (qNMR).<sup>10</sup>



**Figura 2.2.** Técnica de perturbación del desplazamiento químico con RMN de péptidos aplicada en el diseño de nuevos fármacos.

Un ejemplo del empleo de la RMN en el diseño de fármacos es el estudio realizado en colaboración entre el CSIC y la Universidad de La Rioja, sobre la síntesis y el estudio de la actividad de la heparina (Figura 2.2).<sup>11</sup>

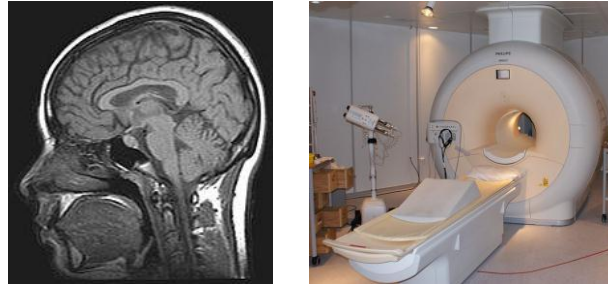
Dentro del mundo de la medicina una de las aplicaciones de las que más conocimiento tiene la sociedad es la de resonancia magnética de imágenes (IRM) (Figura 2.3). En este caso los datos obtenidos de los pacientes se muestran con imágenes. Gracias a esta técnica, no invasiva con el paciente, es posible identificar enfermedades que de otro modo no sería posible.

La investigación relacionada con el medio ambiente y con los alimentos es otro de los ámbitos en los que la RMN aplicada ha crecido enormemente.

<sup>9</sup> Pellecchia, M. *Top Med. Chem.* **2009**, 5, 125–139.

<sup>10</sup> Holzgrabe, U. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2010**, 57, 229–240.

<sup>11</sup> Zhang, Z.; McCallum, S. A.; Xie, J.; Nieto, L.; Corzana, F.; Jiménez-Barbero, J.; Chen, M.; Liu, J.; Linhardt, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12998–13007.



**Figura 2.3.** a) Imagen del cerebro humano, obtenida por IRM, b) equipo de resonancia magnética de imágenes.

Probablemente se debe al hecho de que la preocupación por el medio ambiente y los distintos problemas de contaminación, desde los años 90 hasta ahora, ha aumentado de manera exponencial en nuestra sociedad occidental. De este modo, con los avances en la RMN también se ha conseguido una sensibilidad suficiente para poder detectar contaminantes en agua<sup>12</sup> y aire,<sup>13,14</sup> pesticidas en alimentos<sup>15</sup> o sedimentos de ríos.<sup>16</sup>

En el mundo de los alimentos, el número de trabajos y publicaciones relacionadas con la RMN no ha parado de crecer. En las siguientes figuras se muestran la evolución del número de publicaciones (Figura 2.4 a) y del número de citas (Figura 2.4 b), obtenidas en la base de datos *web of knowledge*<sup>SM</sup>, introduciendo como palabras clave “NMR” y “food”.

---

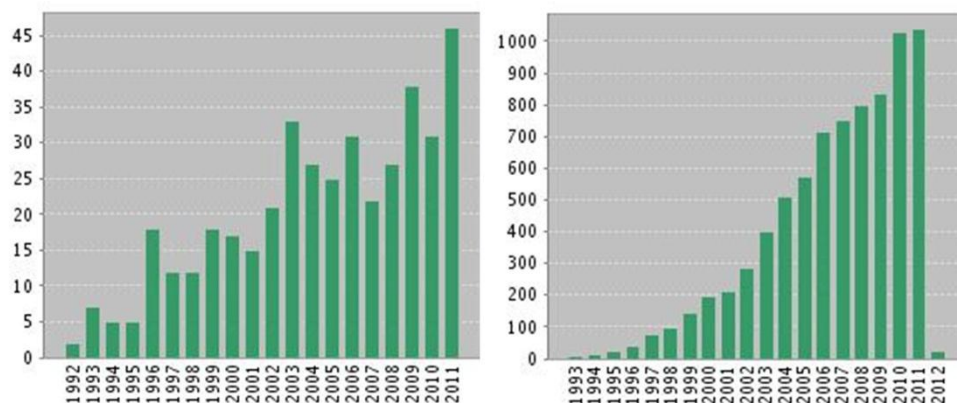
<sup>12</sup> Jacobs, L. E.; Fimmen, R. L.; Chin, Y.-P.; Mash, H. E.; Weavers, L. K. *Water Res.* **2011**, *45*, 4449–4458.

<sup>13</sup> Duarte, R. M. B.O.; Silva, A. M. S.; Duarte, A. C. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 8224–8230.

<sup>14</sup> Zhao, J.; Peng, P.; Song, J.; Ma, S.; Sheng, G.; Fu, J. *Atmos. Environ.* **2011**, *45* 5612–5620.

<sup>15</sup> Liu, X.; Zhang, L.; You, L.; Yu, J.; Zhao, J.; Li, L.; Wang, Q.; Li, F.; Li, C.; Liu, D.; Wu, H. *Ecotoxicology* **2011**, *20*, 177–186.

<sup>16</sup> Wang, J.; Pant, H. K. *Environ. Monit. Assess.* **2010**, *171*, 309–319.



**Figura 2.4.** Evolución de a) el número de publicaciones y b) el número de citas, en *web of knowledge*<sup>SM</sup> introduciendo como palabras clave “NMR” y “food”.

Estos trabajos cubren muchos aspectos que van desde el análisis del agua en alimentos, pasando por el estudio de biopolímeros,<sup>17</sup> sistemas complejos como carne y pescado.<sup>18</sup> Nuevos métodos que incluyen la implementación de otras técnicas junto con la RMN, hasta llegar a los análisis y autenticación de alimentos.

En este contexto, la técnica de RMN de alto campo se ha popularizado en el análisis de alimentos dadas las ventajas de simplicidad en la preparación de la muestra y los procedimientos de medida, estabilidad instrumental y facilidad en la interpretación de los espectros.<sup>19</sup>

Uno de los ejemplos más representativos es el esfuerzo realizado por la compañía Bruker para adaptar la instrumentación de RMN al estudio y análisis de ciertos alimentos. En concreto, la instrumentación de RMN Bruker JuiceScreener<sup>TM</sup> (Figura 2.5) implementa un método para la autenticación, verificación y control de la calidad de zumos de frutas. Además de cuantificar un

<sup>17</sup> Belton, P. S.; Delgadillo, I.; Gil, A. M.; Webb, G.A. *Magnetic resonance in food science* The Royal Society of Chemistry, 1995.

<sup>18</sup> Alberti, E.; Belton, P. S.; Gil, A. M., *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **2002**, 47, 109–148.

<sup>19</sup> Le Gall, G.; Colquhoun, I.J. *NMR spectroscopy in food authentication*, WPL and CRC Press, 2003.

gran número de compuestos característicos, la técnica emplea modelos estadísticos para la estimación del contenido de fruta o el origen del zumo.<sup>20</sup>



**Figura 2.5.** Imagen del equipo Bruker JuiceScreener™.

Sin duda, el campo de las bebidas, tanto no-alcohólicas como alcohólicas, que se presentan como complejas mezclas de diferentes clases de compuestos, es un terreno propicio para la aplicación de la RMN.<sup>21</sup>

Desde el punto de vista analítico se ha estudiado la composición de numerosos alimentos como por ejemplo el mango<sup>22</sup> y alimentos emulsionados.<sup>23</sup> En cuanto a

---

<sup>20</sup> [www.bruker-biospin.com](http://www.bruker-biospin.com) (activa a fecha 6-2-2012)

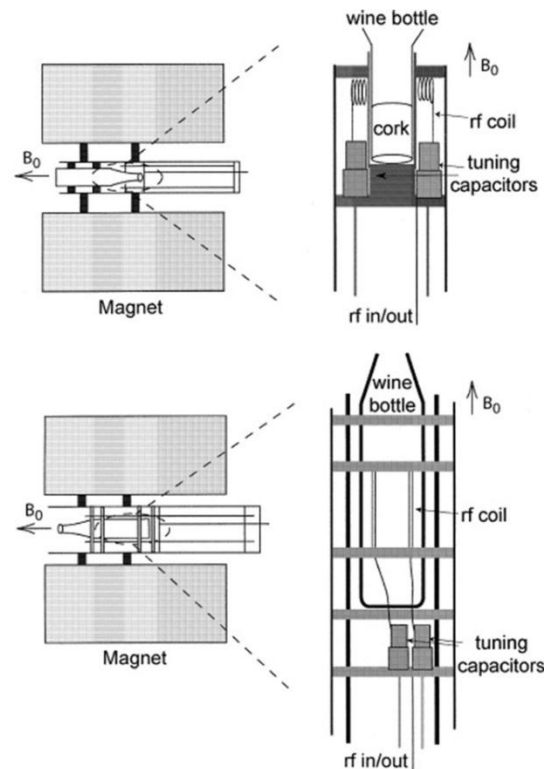
<sup>21</sup> Kidric, J. NMR study of Beverages. Elsevier, 2008.

<sup>22</sup> Jha, S. N.; Narsaiah, K.; Sharma, A. D.; Singh, M.; Bansal, S.; Kumar, R. *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *47*, 1–14.

<sup>23</sup> Voda, M.A.; van Duynhoven, J. *Trends Food Sci. Technol.* **2009**, *20*, 533–543.

la identificación del origen y la calidad de alimentos destacan los estudios realizados sobre el aceite<sup>24</sup> y el vino.<sup>25</sup>

Tal vez en el mundo del vino uno de los trabajos que más han llamado la atención en los últimos años es la investigación de RMN de alta resolución sobre botellas intactas de vino (Figura 2.6).<sup>26</sup>



**Figura 2.6.** Montaje experimental del RMN de alta resolución sobre botellas intactas de vino.

<sup>24</sup> a) Guillén, M. D.; Goicoechea, E. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10729–10736. b) Guillén, M. D.; Uriarte, P. S. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7790–7799. c) Goicoechea, E.; Guillén, M. D. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6234–6245. d) Guillén, M. D.; Uriarte, P. S. *Food Control* **2012**, *24*, 50–56. e) Longobardi, F.; Ventrella, A.; Napoli, C.; Humpfer, E.; Schütz, B.; Schäfer, H.; Kontominas, M.G.; Sacco, A. *Food Chem.* **2012**, *130*, 177–183.

<sup>25</sup> Son, H. S.; Hwang, G. S.; Kim, K. M.; Ahn, H. J.; Park, W. M.; van den Berg, F.; Hong, Y. S.; Lee, C. H., *J. Agr. Food Chem.* **2009**, *57*, 1481–1490.

<sup>26</sup> Weekley, A.J.; Bruins, P.; Sisto, M.; Augustine, M.P. *J. Magn. Reson.*, **2003**, *161*, 91–98.

La venta o subasta de botellas de vino de alta expresión, elevado coste y con cierto número de años se enfrenta a variables poco controladas como por ejemplo el contenido de ácido acético. La RMN de botellas intactas de vino permite calcular el nivel de ácido acético sin necesidad de descorche y manteniendo el valor añadido de la botella.

Las técnicas de RMN con supresión de agua han permitido en los últimos años la asignación de algunos de los cientos de compuestos presentes en el vino. Así, se han detectado y asignado algunos ácidos orgánicos, alcoholes superiores, glicerol, aminoácidos... La diferente distribución de estos compuestos, en función del origen geográfico, la manipulación enológica, el tipo de crianza, son sin duda datos que van más allá de la acumulación de números y permiten y permitirán establecer parámetros de calidad con el objeto de satisfacer al consumidor.

Otra faceta en el que la RMN juega un papel importante en el mundo de los alimentos es el estudio de los procesos microbiológicos. Gran parte de los alimentos sufren algún proceso fermentativo o de transformación microbiana para ser elaborados, como es el caso de la cerveza, el queso o el vino. A la hora de obtener un alimento de calidad es necesario conocer perfectamente su proceso de elaboración. En este sentido, son muchos los trabajos realizados con RMN para conocer los mecanismos de transformación. Rodrigues y colaboradores realizaron un seguimiento mediante RMN de protón del envejecimiento de la cerveza,<sup>27</sup> observando los compuestos que más variación sufrían. Del mismo modo, también en Aveiro, se realizó el seguimiento del proceso de elaboración del queso analizando las muestras desde el momento inicial hasta los 60 días.<sup>28</sup> En este sentido la RMN de carbono-13 juega un papel muy importante en el seguimiento

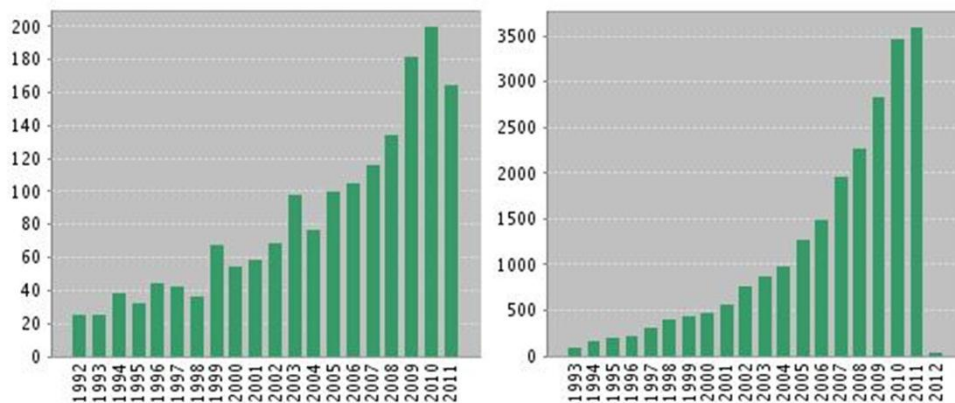
---

<sup>27</sup> Rodrigues, J. A.; Barros, A. S.; Carvalho, B.; Brandão, T.; Gil, A. M. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702*, 178–187.

<sup>28</sup> Rodrigues, D.; Santos, C. H.; Rocha-Santos, T. A. P.; Gomes, A. M.; Goodfellow, B. J. Freitas, A. C. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 4955–4961.

de rutas metabólicas por la adición de compuestos marcados con el isótopo de carbono-13.<sup>29</sup>

Las siguientes gráficas de la Figura 2.7 muestran la evolución del número de publicaciones que incluyen entre sus palabras clave “wine” y “NMR”. Así mismo, se muestra la evolución creciente del número de veces que han sido citadas dichas publicaciones (*web of knowledge*<sup>SM</sup>).



**Figura 2.7.** Evolución de a) el número de publicaciones y b) el número de citas, en *web of knowledge*<sup>SM</sup> introduciendo como palabras clave “NMR” y “wine”.

La investigación en alimentos es el campo de aplicación de la RMN en el que más utilidad y resultados se están obteniendo, después del campo de la medicina, y el que está en claro desarrollo debido a la potencial aplicabilidad que se ha descubierto. Por este y por otros motivos esta Tesis Doctoral se centra en el estudio del vino mediante la resonancia magnética nuclear.

<sup>29</sup> Polášcova, P.; Herszage, J.; Ebeler, S. E. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2478–2489.



### 2.3. Objetivos

Los objetivos de esta tesis quedan brevemente recogidos en estos tres puntos:

1. Puesta a punto de un método de cuantificación, empleando la RMN de protón y su posterior aplicación, para el seguimiento de la elaboración del vino.
2. Clasificación de muestras de vinos procedentes de diferentes bodegas de la D.O.Ca. empleando el tándem RMN y quimiometría.
3. Puesta a punto de un método para el seguimiento de compuestos marcados isotópicamente a lo largo de los procesos fermentativos del vino, así como su aplicación para el estudio de la transformación de los aminoácidos durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica de un vino.



## Capítulo 3

### Material y métodos

#### 3.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

*3.1.1. Fundamentos básicos del RMN*

*3.1.2. Equipos de RMN empleados*

*3.1.3. Adquisición y procesado de los espectros de RMN*

#### 3.2. Análisis mediante infrarrojo

#### 3.3. Análisis mediante test enzimático

*3.3.1. Análisis del ácido málico*

*3.3.2. Análisis del ácido láctico*

#### 3.4. Métodos quimiométricos

*3.4.1. Análisis de componentes principales (PCA)*

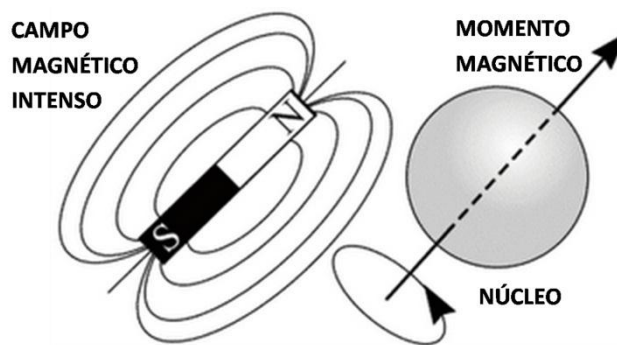
*3.4.2. Análisis de variables canónicas extendidas (ECVA) y de intervalos (iECVA)*



### 3.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

#### 3.1.1. Fundamentos básicos de la RMN

La resonancia magnética nuclear (RMN) es un método espectroscópico de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de energía de radiación electromagnética por parte de núcleos atómicos que tienen un momento magnético (Figura 3.1). Dicha absorción ocurre a frecuencias características que dependen del tipo de núcleo (protón, carbono-13...) y del entorno molecular en que se encuentran y sólo tiene lugar en presencia de un campo magnético intenso.



**Figura 3.1.** Esquema del fundamento de la RMN.

Los momentos magnéticos de los distintos núcleos, en presencia de un campo magnético externo, se alinean respecto a dicho campo externo. Sólo cuando se les aplica un pulso de radiofrecuencia, perpendicular al campo magnético externo, se les aparta del estado de equilibrio y así se observa su vuelta al mismo y se detecta la señal que genera.<sup>1</sup>

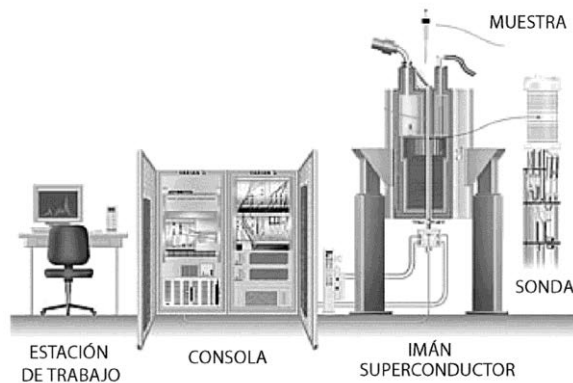
Un equipo de RMN consta de numerosos componentes, pero los más importantes o esenciales son: un campo magnético estable, intenso y homogéneo

---

<sup>1</sup> Macomber, R. S. *Complete introduction to nuclear magnetic resonance NMR*, Wiley, 1998.

para polarizar los espines; una sonda compuesta por una o varias bobinas tanto para la excitación como la detección de los espines; un transmisor de radiofrecuencia de alta potencia para producir los pulsos y así generar la excitación; un programa de pulsos que controle con precisión los tiempos de los pulsos y entre pulsos; un sistema de detección para amplificar y detectar la respuesta; un digitalizador que convierta la señal en una forma que permita almacenarla en un ordenador y por último un ordenador para el control de todo el sistema y para el procesado de la señal.<sup>1</sup>

En la Figura 3.2 se representa un esquema básico de un espectrómetro de RMN, en él aparecen la sonda, el imán superconductor, la estación de trabajo y la consola. Dentro de esta última se engloban la mayoría de los sistemas electrónicos y sistemas periféricos que controlan el imán y la sonda.

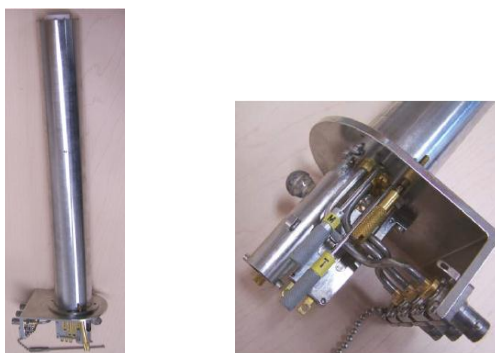


**Figura 3.2.** Esquema básico de un espectrómetro de RMN.

El imán es el elemento clave del espectrómetro y el que va a proporcionar el campo magnético. Además, dicho imán debe cumplir unas condiciones en cuanto a la intensidad, la homogeneidad y la estabilidad del campo magnético que puede generar.

En los orígenes de la RMN los imanes era permanentes o electroimanes, pero los empleados en la actualidad son imanes superconductores que aseguran un campo magnético más intenso y estable. Dichos imanes son bobinas superconductoras formadas normalmente de niobio y titanio o niobio y estaño, que para mantener intactas sus propiedades deben encontrarse a 4.2 K, lo que conlleva que deben estar sumergidos en helio líquido (4.2 K) y rodeados de nitrógeno líquido (77 K).

La sonda es la parte del espectrómetro donde se introduce la muestra,<sup>2</sup> se encuentra en el centro del imán tiene forma cilíndrica (Figura 3.3) y posee dos bobinas que permiten la aplicación de pulsos y la detección a la frecuencia de uno o más núcleos. En función de esta última propiedad las sondas empleadas a lo largo de esta tesis son de dos tipos: la BBI, sonda de banda ancha optimizada para la detección de protón y la BBO y la BBFO, sondas de banda ancha optimizadas para la detección de heteronúcleos, en este caso de carbono-13.



**Figura 3.3.** Imagen de una sonda de RMN.

También, a lo largo de este trabajo se empleó otro tipo de sonda denominada criosonda donde se reduce la temperatura de las bobinas y de los preamplificadores. Con ella se aumenta la sensibilidad en la detección y se

---

<sup>2</sup> Jacobsen N. E., *NMR spectroscopy explained simplified theory, applications and examples for organic chemistry and structural biology*, Wiley 2007.

disminuye el tiempo de adquisición de los espectros, gracias a que se elimina el ruido electrónico con ayuda de un amplificador más potente y una unidad de control de enfriado.<sup>3</sup>

### 3.1.2. Equipos de RMN empleados

Los equipos de RMN se suelen clasificar no por la intensidad del campo magnético externo sino por la frecuencia de Larmor del protón (velocidad de giro del protón alrededor del vector de campo magnético). En este caso los equipos empleados fueron un espectrómetro Bruker Avance II 400 (400 MHz para protón) y un Bruker Avance III 600 (600 MHz para protón).

El espectrómetro Bruker Avance II 400 (Figura 3.4) está equipado con una sonda BBI H-BB Z-GRD, específica para una adecuada adquisición de protón y por las sondas BBO BB-1H Z-GRD y BBFO, específicas para la adquisición de heteronúcleos y todas preparadas para tubos de RMN de 5 mm.



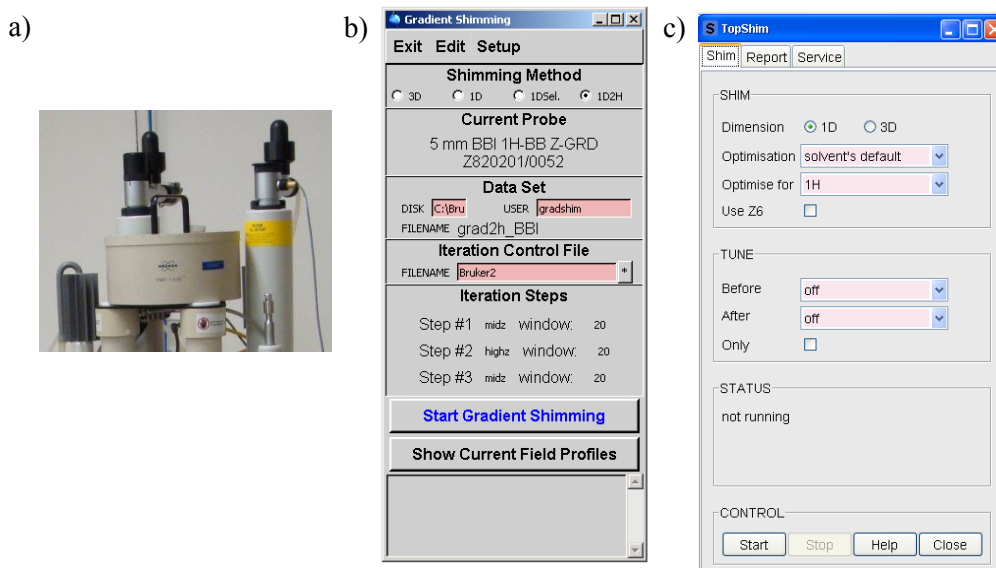
**Figura 3.4.** Equipo Bruker Avance II 400.

---

<sup>3</sup> Claridge, T. *High resolution NMR spectroscopy in organic chemistry* 2nd ed Elsevier, 2009.



También posee las herramientas GRADSHIM y TOPSHIM\*, y la aplicación ICON NMR y NMR CASE\*\* (Figura 3.5). Éstas permiten el tratamiento de un número mayor de las muestras y de un modo más automático.

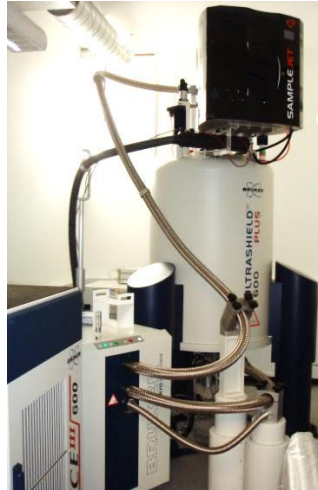


**Figura 3.5.** a) Foto del NMR CASE b) imagen de la pantalla del Gradshim c) imagen de pantalla del Topshim.

El otro equipo empleado, el espectrómetro Bruker Avance III 600 (Figura 3.6), está equipado con una criosonda (TCI) preparada para tubos de RMN de 5 mm. En este caso la sensibilidad que posee este equipo es bastante superior al otro empleado gracias al imán más potente y a la criosonda.

\* Aplicación incluida en el programa *TOPSPIN* para la homogeneización correcta y automática del campo magnético.

\*\* Sistema para la introducción automática de tubos de RMN.



**Figura 3.6.** Equipo Bruker Avance III 600.

En este caso el equipo está equipado con el accesorio SAMPLE JET (Figura 3.7 a), que permite el tratamiento de hasta 480 muestras al colocarlas en cajas de 96 tubos de RMN de 5 mm de diámetro (Figura 3.7 b). Además está refrigerado, lo que permite mantener las muestras termosensibles a la temperatura óptima hasta el momento de su adquisición o análisis.



**Figura 3.7.** a) Interior del *Sample Jet* y b) caja de tubos de RMN.

### 3.1.3. Adquisición y procesado de los espectros de RMN

A la hora de trabajar con RMN buscando una correcta cuantificación y reproducibilidad es necesario ajustar tres parámetros: P1 o pulso de excitación a  $90^\circ$ , D1 o retardo entre pulsos y RG (*receiver gain*) o ganancia del receptor. Como paso previo, es necesario calibrar el pulso de excitación P1. A continuación, generalmente, el proceso de adquisición es repetido un número de veces (*scans*, ns) con el fin de sumar las FIDs e incrementar la relación señal ruido (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Esquema de adquisición y procesado de un espectro con los parámetros más importantes especificados para cada paso.

La FID es una señal oscilante que detecta el RMN y contiene toda la información espectral y desciende hasta hacerse cero. Esta caída de señal se conoce como caída libre de inducción, en inglés *Free Induction Decay*, de ahí su abreviación como FID. Realmente esta FID es una onda dependiente del tiempo que puede convertirse en un espectro de señales en función de su frecuencia, simplemente utilizando una función matemática conocida como Transformada de Fourier (FT), (Figura 3.8).

Previo a esta operación, y con el fin de que la FID ofrezca la máxima resolución y se anulen posibles artefactos, se multiplica la FID por una función exponencial. Esta multiplicación exponencial se denomina EM (multiplicación exponencial) y para modular su valor se emplea el comando LB (*Line Broadening*).<sup>3</sup>

Para que la recepción de la señal emitida por los núcleos después de la excitación con una radiofrecuencia sea adecuada, en otras palabras para que la magnetización vuelva al equilibrio después de una perturbación, ha de pasar cierto tiempo. Este tiempo antes de proceder a un nuevo scan, está controlado por el parámetro D1, que debe ser unas 5 veces superior al tiempo de relajación de los núcleos (tiempo de vuelta al equilibrio). Los diferentes núcleos de una molécula y evidentemente, los núcleos de diferentes moléculas, poseen diferentes tiempos de relajación. Para una correcta cuantificación de todos los compuestos la literatura recomienda un tiempo de retardo suficientemente elevado.

Por otro lado, la señal emitida por los núcleos al volver al equilibrio después de la acción de un pulso de radiofrecuencia no es excesivamente intensa, y necesita ser ampliada mediante los correspondientes preamplificadores. Para ajustar la sensibilidad de estos amplificadores a la señal recibida (señal que evidentemente depende de la concentración de la muestra) se emplea el comando RGA que hace un ajuste automático del parámetro RG.<sup>2</sup> Para obtener una reproducibilidad adecuada este parámetro debe ser constante en todos los experimentos. Por ello, se

optó por fijar el parámetro RG igual en todos los experimentos y que fuera un compromiso entre los valores observados en los diferentes ensayos previos.

Una de las características principales de trabajar con RMN es la rapidez y sencillez en el modo de trabajo. El tratamiento previo de la muestra solo consiste en dos pasos:

- Medición del pH y su ajuste a 3 con una disolución de HCl 1 M, para fijar el desplazamiento químico. Dicho desplazamiento está expresado en partes por millón (ppm).
- Dilución de la muestra, tomando 450  $\mu\text{L}$  de vino y 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , adicionándolos en un tubo de RMN. Para calibrar el desplazamiento químico en cada espectro, la sal sódica del ácido 2,2,3,3- $\text{d}_4$ -(trimetilsilil)propanoico (TSP) se disuelve en  $\text{D}_2\text{O}$  y se adiciona al tubo.

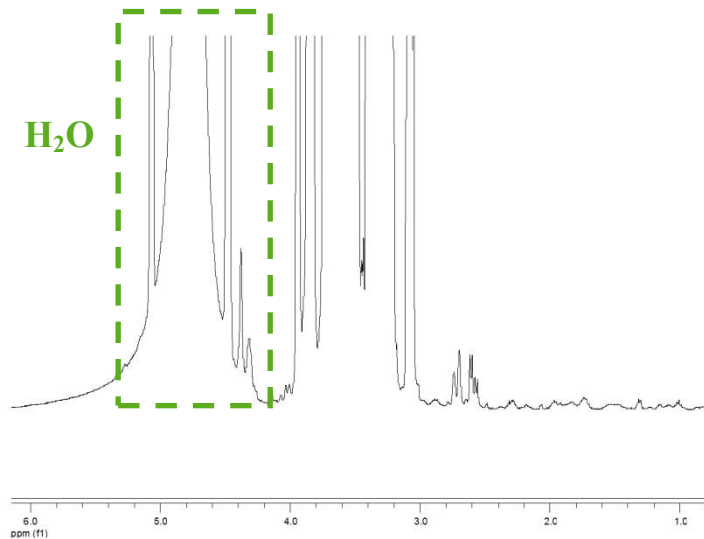
Con el fin de mejorar los resultados, sobre todo a la hora de aplicar quimiometría sobre los espectros, se hizo una pequeña modificación de los tratamientos previos, aumentando éstos a tres:

- Medición del pH y su ajuste a 3 con una disolución de HCl 1 M, para fijar el desplazamiento químico.
- Centrifugado de las muestras a 15000 rpm, con el fin de eliminar los sólidos disueltos.
- Dilución de la muestra, en este caso, tomando 540  $\mu\text{L}$  de vino y 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , con la sal sódica del ácido 2,2,3,3- $\text{d}_4$ -(trimetilsilil)propanoico (TSP).

- **Espectros de RMN de protón**

En la bibliografía se encuentran principalmente dos métodos de adquisición de los espectros de RMN de protón en vino. Uno de ellos emplea la liofilización previa del vino y su posterior disolución en D<sub>2</sub>O. El otro método es la supresión de la señal del agua en el espectro de RMN mediante un programa de pulsos específico del equipo, empleando como disolvente H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O en proporción 9:1.

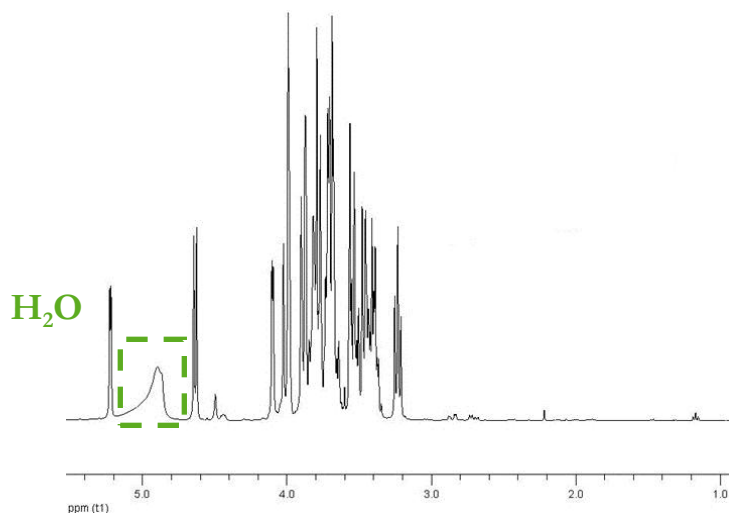
El método de liofilización tiene como punto a favor la posibilidad de concentrar la muestra y el gran inconveniente de la eliminación parcial o total de los compuestos volátiles (Figura 3.9). Por ello, los resultados obtenidos no son todo lo favorables que se esperaba. El alto contenido en azúcares presentes en el mosto impide la eliminación total del agua de la muestra, de manera que el espectro se ve afectado también por la presencia de su señal.



**Figura 3.9.** Espectro de RMN de protón (400MHz) de mosto liofilizado.

Además, mediante este método se pierde la ventaja que posee la RMN frente a otras técnicas analíticas como son la rapidez y la sencillez.

Con el segundo método se elimina la señal del agua en el espectro durante su adquisición mediante el equipo de RMN, obteniendo de este modo un espectro de vino sin apenas señal de agua, como se puede observar en la Figura 3.10, y sin distorsionar el resto de las señales.



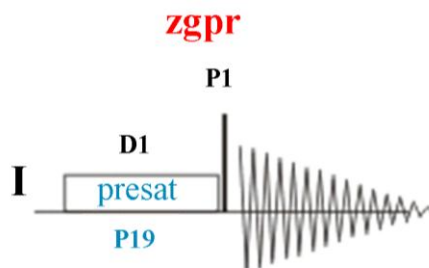
**Figura 3.10.** Espectro de RMN de protón (400MHz) de mosto con supresión de agua.

En función de la aplicación que se le va a dar al espectro de RMN de protón los parámetros de adquisición y de procesado del espectro son diferentes. En esta tesis, fundamentalmente se han utilizado los espectros para la cuantificación de compuestos en el vino y para estudios quimiométricos.

- **Método para la aplicación cuantitativa de los espectros de RMN de protón**

Se optimizaron todos los parámetros de adquisición y de procesado para que se pudieran obtener espectros adecuados para su cuantificación. Los espectros de RMN de protón fueron registrados empleando el equipo Bruker Avance 400 con una secuencia de pulsos de presaturación de la señal de agua situada a 1875 Hz, usando el programa de pulsos zgpr con valor del pulso P19 situado en 60 dB y un ángulo de 90° (Figura 3.11). Se probaron otros programas de pulsos para la

eliminación de la señal de agua como el denominado W5, pero aunque la supresión fue excelente, la distorsión de las señales cercanas impedía una adecuada cuantificación. La anchura espectral fue de 10 ppm adquiriendo los datos con 4 *scans* previos (*dummy scans*) y 128 *scans* de adquisición conformando un tamaño de FID de 64 k. La ganancia del receptor (RG) fue fijada en 16 y el D1 en 60 s.



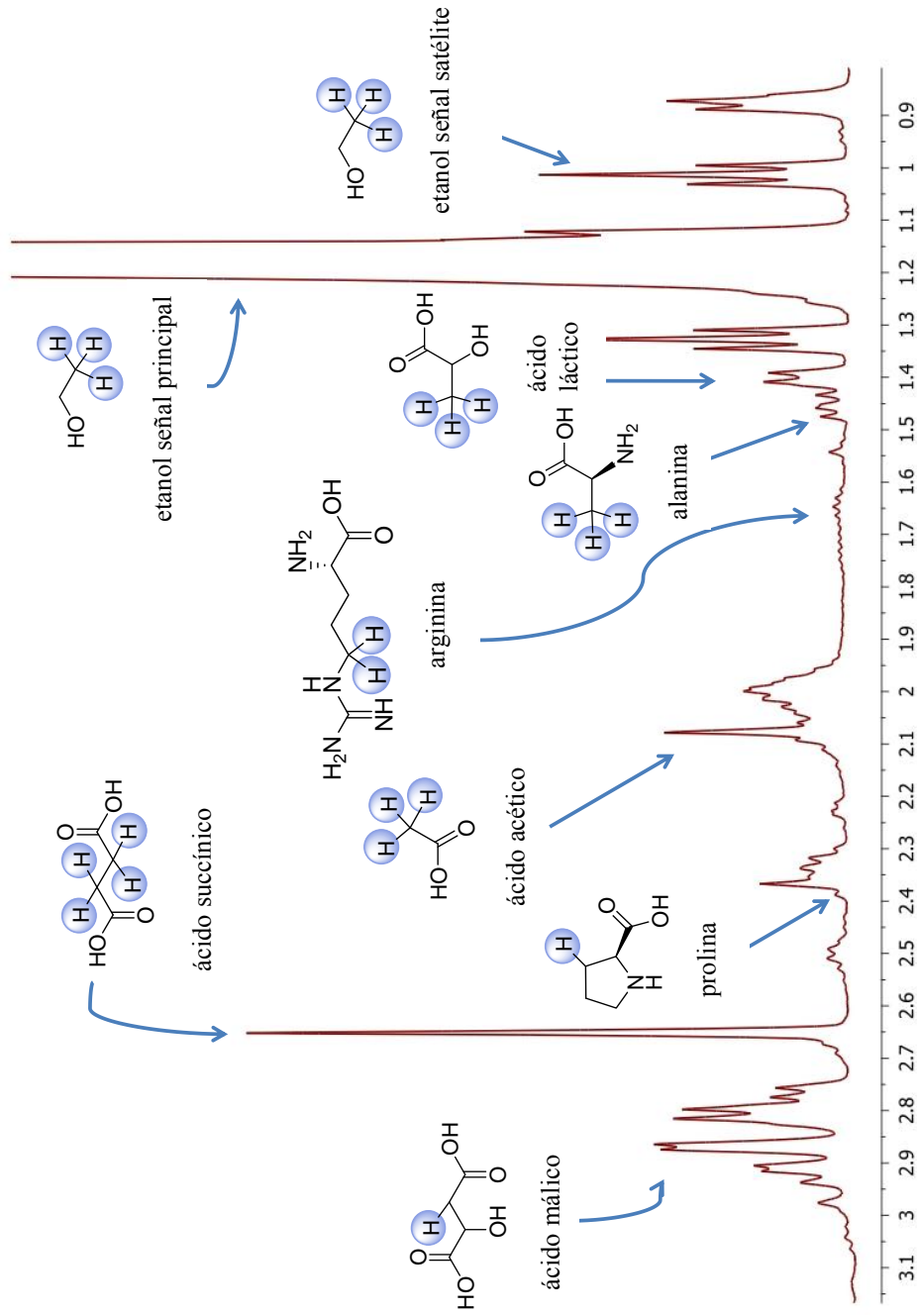
**Figura 3.11.** Programa de pulsos de supresión de la señal de agua P1= pulso de 90° y D1= retardo entre pulsos.

La FID fue exportada a los programas MestRe-C y MestReNova, en donde se realizó el procesado. En primer lugar, se realizó la transformada de Fourier ajustándola con una multiplicación exponencial cercana a cero (0.01Hz), para obtener una relación señal/ruido óptima. De acuerdo con la bibliografía,<sup>4</sup> la fase del espectro se ajustó manualmente utilizando el submenú *Phase Correction* mientras que la línea base se ajustó mediante la función *Multipoint Baseline Correction*.

La zona del espectro en la cual se procedió a la corrección de la línea base de un modo más exhaustivo durante el procesado fue el intervalo de 0.8 a 3.2 ppm, y la zona 6.3 a 10.0 ppm. Este proceso se realizó manualmente al igual que la integración de cada señal del espectro. A lo largo de estas regiones fueron muchos los compuestos estudiados, los cuales se pueden observar en la siguiente gráfica, y serán el objeto de la cuantificación (Figura 3.12).

<sup>4</sup> Pauli, G. F. *Phytochem. Anal.* **2001**, *12*, 28–42.

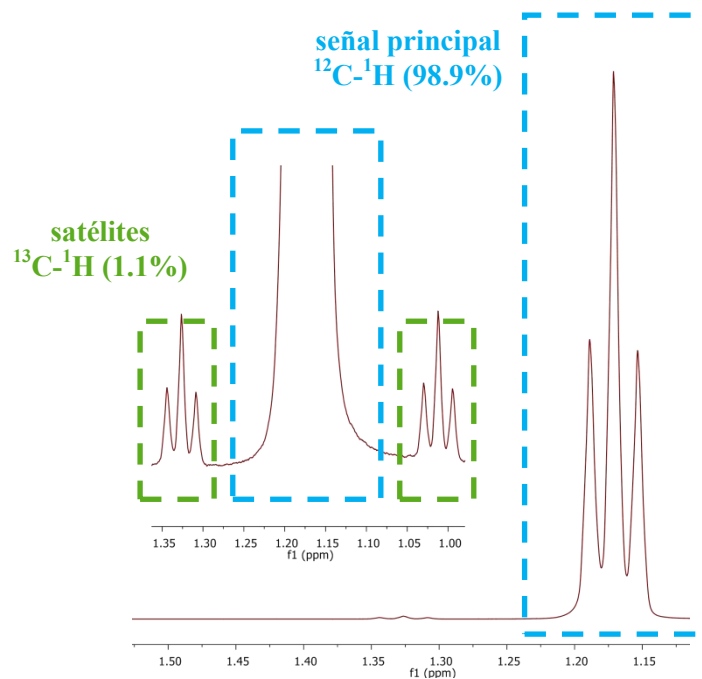




**Figura 3.12.** Espectro de RMN de protón de una muestra de vino. Componentes a analizar

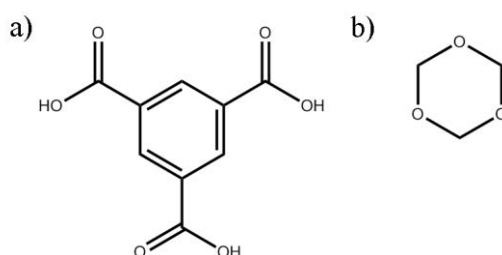


La señal correspondiente al  $\text{CH}_3$  del etanol aparece a un desplazamiento de 1.18 ppm, y se observan tres señales en lugar de una única en forma de triplete (Figura 3.13). Los picos que aparecen a ambos lados de la señal principal se denominan satélites y representan el 1.1% de carbono-13 presente de modo natural en el etanol. De manera que, al existir gran cantidad de etanol en la muestra no sólo se alcanza a ver la señal de los protones enlazado al carbono-12, mayoritario con una abundancia natural del 98.9%, sino que también se observan las señales correspondientes al 1.1% de los protones enlazados a carbono-13.



**Figura 3.13.** Señal del etanol, pico principal y satélites en un RMN de protón de vino.

Tal y como se recoge en la bibliografía, existen varios métodos para la cuantificación empleando espectros de RMN. Uno de ellos es el empleo de la adición de patrones internos al vino,<sup>5</sup> pero se rechazó por varios motivos. Los compuestos aromáticos, como el ácido 1,3,5-bencenotricarboxílico, no se utilizaron debido a que su señal se encontraba bastante apartada de las señales a estudiar, de modo que la corrección de la línea base no se realizaba de modo eficiente en las zonas próximas al patrón interno, viéndose afectada su área. Tampoco se pudieron emplear como patrones internos compuestos como el 1,3,5-trioxano, debido a que sus señales solapaban con señales de interés en el vino (Figura 3.14).



**Figura 3.14.** Moléculas de a) ácido 1,3,5-bencenotricarboxílico y b) 1,3,5-trioxano.

Se optó por emplear un método que analizaba en dos tubos idénticos y por separado la muestra y el patrón externo.<sup>6</sup> Dicho patrón externo conviene que esté presente de manera natural en la muestra, para poder relacionar los componentes del vino con el estándar de referencia. Con este procedimiento se puede medir directamente en la muestra sin contaminarla ni modificar ninguna señal del espectro.

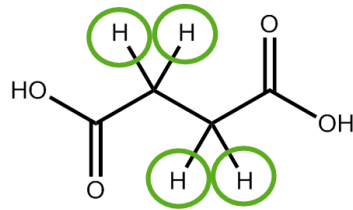
Por estas razones se empleó la referencia externa en diferentes tubos pero manteniendo los mismos parámetros de adquisición y procesado, tanto para la muestra como para el patrón externo. Se tuvo especial cuidado con los valores de

<sup>5</sup> Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133–149.

<sup>6</sup> Burton, I. W.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3123–131.

RG puesto que, como se comenta en el apartado anterior, este valor debe ser el mismo para todos los experimentos. Así, se registraron diversos espectros para optimizar la correlación entre áreas con el adecuado valor de RG.

La referencia externa escogida fue el ácido succínico, con cuatro protones equivalentes que conforman un singlete a 2.65 ppm (Figura 3.15). El experimento se realizó en un tubo de RMN con cantidad conocida del compuesto de referencia y se llevó a cabo en las mismas condiciones usadas para los experimentos del vino y del mosto.



**Figura 3.15.** Molécula de ácido succínico, señalando los 4 protones equivalentes utilizados para la cuantificación.

Del mismo modo, se realizaron sendos experimentos para los analitos con cantidades conocidas de ambos. De esta manera, se obtuvo una constante ( $k$ ) para cada compuesto que los relaciona con el patrón externo:

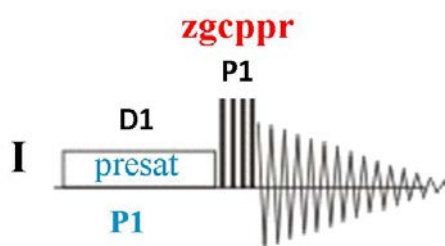
$$k = A_{PE}/A_A \times C_A/C_{PE} \times N_A/N_{PE}$$

donde  $A_{PE}$  es la integral absoluta del patrón externo (ácido succínico),  $A_A$  es la integral absoluta del analito a determinar,  $C_A$  es la concentración del analito,  $C_{PE}$  es la concentración del patrón externo,  $N_A$  es el número de protones para la señal del analito y  $N_{PE}$  es el número de protones para el patrón externo (ácido succínico 4H).

- **Método para la aplicación quimiométrica de los espectros de RMN de protón**

En este caso, los parámetros de adquisición y de procesado de los espectros de RMN de protón se optimizaron para que fueran adecuados para la aplicación de quimiometría directamente sobre los espectros. En este tipo de análisis quimiométrico no sólo es necesario que la adquisición de los espectros posea una reproducibilidad óptima, sino también que todos los espectros estén perfectamente alineados y con una correcta línea base en todas las zonas del espectro.

Los espectros de RMN de protón fueron registrados empleando el equipo Bruker Avance III 600. Este equipo es más sensible, de modo que los parámetros de adquisición se modificaron ligeramente. Los programas de pulsos de presaturación de la señal del agua empleados fueron dos, bastante similares entre sí: zgpr (Figura 3.11) y el zgcppr (Figura 3.16).



**Figura 3.16.** Programa de pulsos de supresión de la señal de agua P1= pulso de 90°, en este caso se realizan 4 con un tiempo fijado entre cada uno y D1= retardo entre pulsos.

El programa de pulsos zgcppr fue utilizado para obtener espectros sólo para la aplicación quimiométrica. Dicha secuencia de pulsos situó la presaturación de la señal de agua en 2822.65 Hz. La anchura espectral fue de 20.5 ppm adquiriendo los datos con 2 *scans* previos (*dummy scans*) y 64 *scans* de adquisición conformando un tamaño de FID de 64 k. La ganancia del receptor (RG) fue fijada y el tiempo de relajación (D1) se estableció en 10 s.

El tipo de tratamiento quimiométrico que se realizó tuvo lugar directamente sobre los espectros, realizando una comparación cuantitativa de los mismos. De este modo, el procesado de los espectros es muy importante y debe ser el mismo en todos los casos.

La FID fue exportada al programa MestReNova (version 6.0), con el que se realizó la transformada de Fourier ajustándola con una multiplicación exponencial de 0.3 Hz para obtener una relación señal/ruido óptima. De acuerdo con la bibliografía, la fase del espectro se ajustó manualmente utilizando el submenú *Phase Correction* mientras que la línea base se ajustó mediante la función *Multipoint Baseline Correction*.<sup>4</sup> En este caso, se procedió a la corrección de la línea base de un modo exhaustivo sobre todo el espectro de RMN.

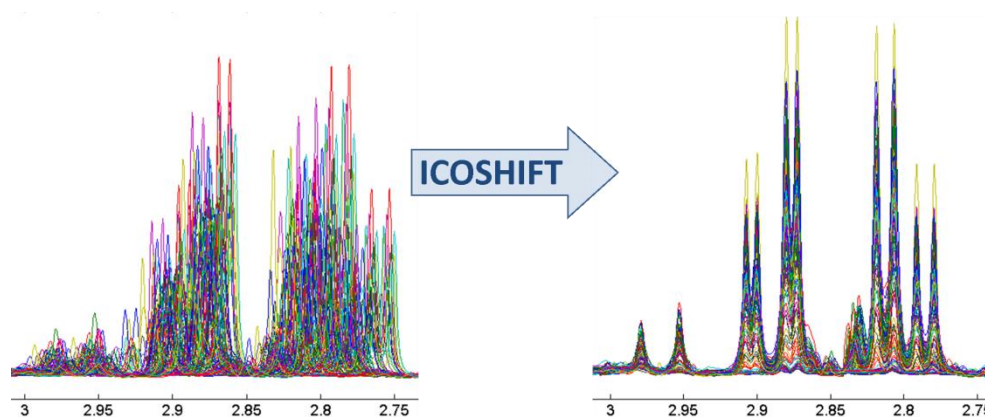
Después, se extrajo cada espectro como archivo txt, con el fin de poder seguir su procesado con el programa Matlab<sup>®</sup> (2007<sup>a</sup>, The Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Como antes se ha mencionado, para realizar un estudio quimiométrico sobre los espectros de RMN, quizá la parte más importante del procesado, junto con el ajuste de la línea base, es la alineación de los espectros y la normalización de los mismos. La normalización se llevó a cabo sobre la matriz de datos con el fin de corregir los errores de escala vertical debidos a los diferentes contenidos de agua en las muestras. Todos los espectros se normalizaron con respecto a un área unitaria, técnica que iguala la intensidad global de todo el espectro de las muestras, no afectando la concentración relativa de los picos de cada espectro y que conduce a mejorar la interpretación y la cuantificación de los datos.<sup>7</sup>

En segundo lugar, se corrigió la matriz de datos, ya normalizados, de los desajustes en el desplazamiento químico provenientes sobre todo de su dependencia del pH. Dicho ajuste se realizó mediante la alineación de las señales

---

<sup>7</sup> Craig, A.; Cloarec, O.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2262–2267.

usando la herramienta ICOSHIFT (*Interval Correlation Optimized Shifting*).<sup>8</sup> De este modo, los espectros de RMN de protón quedan preparados para realizar un estudio quimiométrico en profundidad (Figura 3.17).



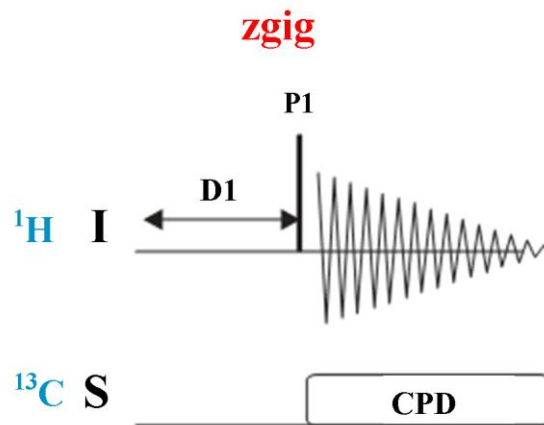
**Figura 3.17.** Señal de los ácidos málico y cítrico en un espectro de RMN de protón antes y después del procesado con la herramienta ICOSHIFT y de la normalización de las señales.

---

<sup>8</sup> Savorani, F.; Tomasi, G.; Engelsen, S. B. *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 190–202.

- Espectros de RMN de carbono-13

Del mismo modo que trabajando con un espectro de RMN de protón, se optimizaron todos los parámetros de adquisición y de procesado que permitieran obtener espectros adecuados para su estudio y cuantificación. Los espectros de RMN de carbono-13 fueron registrados con una secuencia de pulsos de zig con *Inverse Gated <sup>1</sup>H-Decoupling* que elimina el efecto nuclear Overhauser (NOE) (Figura 3.18).



**Figura 3.18.** Programa de pulsos de supresión de la señal de agua P1 = pulso de 90°, D1 = retardo entre pulsos y CPD = desacoplamiento.

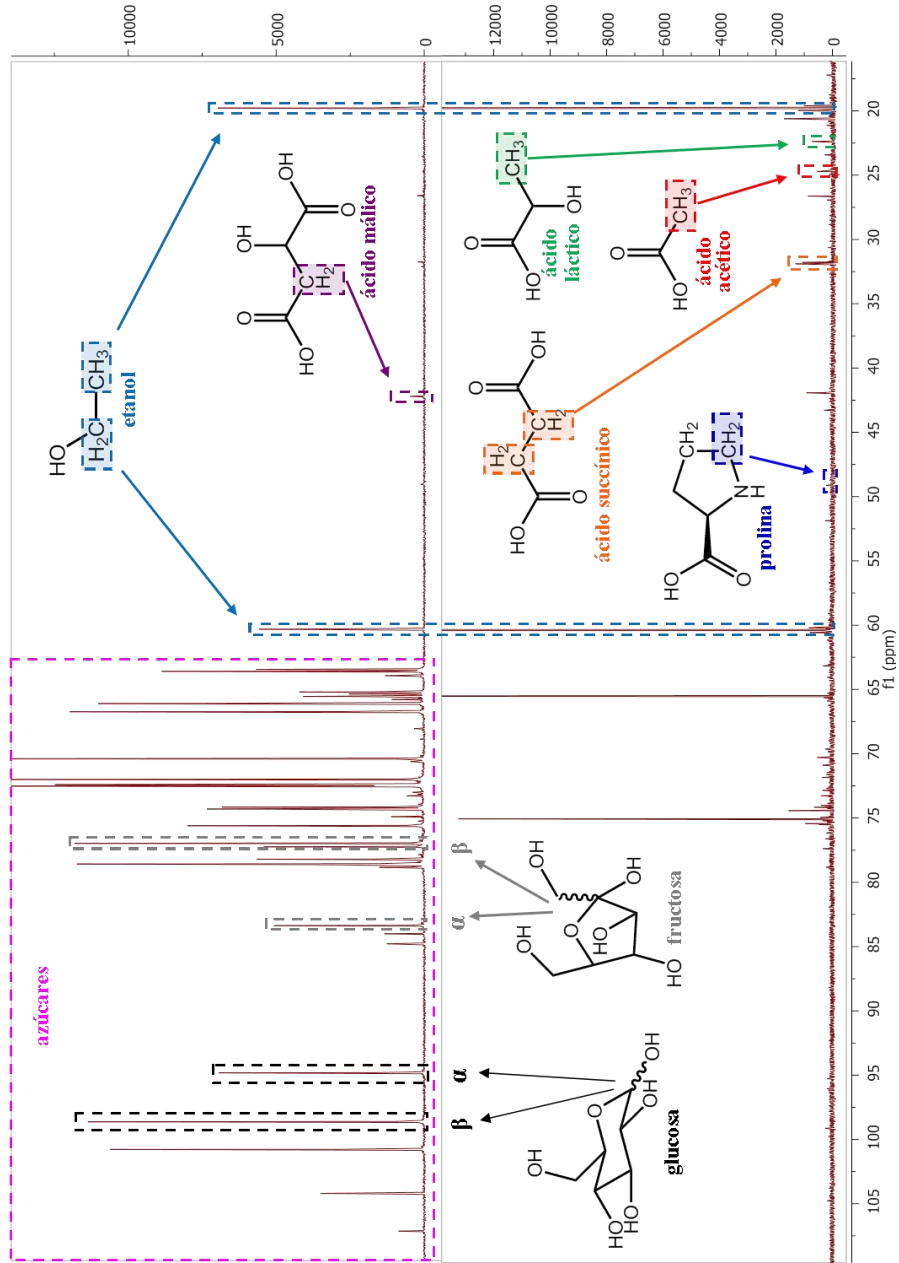
La FID fue exportada a los programas MestRe-C y MestReNova, programas en los cuales se realizó el procesado. En primer lugar se realizó la transformada de Fourier ajustándola con una multiplicación exponencial de 1Hz, para obtener una relación señal/ruido óptima. La fase del espectro se ajustó manualmente utilizando el submenú *Phase Correction* mientras que la línea de base se ajustó mediante la función *Automatic Baseline Correction*.



En un espectro de RMN de carbono-13, al igual que en uno de protón, se pueden estudiar simultáneamente numerosos compuestos. En la Figura 3.19 se puede observar un espectro de RMN de carbono-13 para una muestra de mosto (**A**) y una muestra de vino (**B**).

La zona del espectro que se muestra en la Figura 3.19, corresponde a la zona donde aparecen los compuestos mayoritarios de las muestras de mosto y del vino. La sensibilidad de un espectro de carbono-13 es muy inferior a la de un espectro de protón. La abundancia natural del carbono-13 es sólo del 1.1% de manera que en un espectro de vino sólo se podrán observar señales de compuestos mayoritarios. A primera vista, esto podría suponer un problema a la hora de trabajar con compuestos minoritarios, pero utilizando compuestos marcados isotópicamente con carbono-13 con una abundancia del 99.0%, se aprovecha dicha desventaja y se convierte en una virtud. Esta última será la herramienta que se utilizará en los estudios realizados en esta tesis.

Como conclusión de este apartado sobre el RMN en muestras de vino se puede decir que a partir de un solo espectro, y por tanto un solo experimento, se puede acceder a la cuantificación y estudio simultáneo de numerosos compuestos, tanto con los espectros de RMN de protón como de carbono-13 y sin apenas tratamiento previo sobre la muestra.



**Figura 3.19.** Espectro de RMN de carbono-13 de una muestra de a) mosto y b) vino.

### 3.2. Análisis mediante infrarrojo

El equipo de infrarrojo Foss WineScan™ FT120 (Figura 3.20) es utilizado para análisis de rutina en bodegas donde el número de muestras a analizar es abundante y el resultado es necesario con una cierta rapidez.

Este equipo utiliza un interferómetro FTIR (espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier), que escanea el espectro completo de infrarrojo. Sin preparación de la muestra y en apenas 30 segundos realiza numerosos análisis, tanto en muestras de mosto como en vino. El equipo requiere una calibración bastante constante y costosa para asegurar unos análisis robustos.



**Figura 3.20.** Foto del equipo de infrarrojo Foss WineScan™ FT120.

Los análisis que se realizaron tanto en mostos como en vinos fueron: grado alcohólico (v/v), azúcar (glucosa-fructosa, g/L), acidez total, (ácido tartárico, g/L), pH, ácido málico (g/L), ácido láctico (g/L) y acidez volátil (ácido acético, g/L).

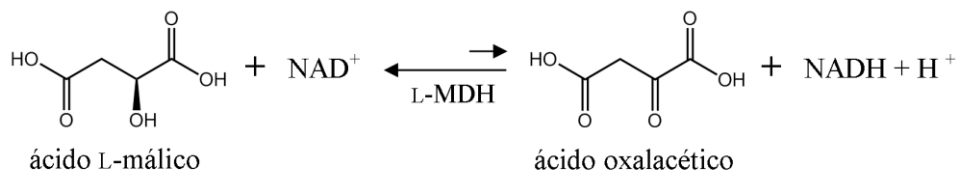
### 3.3. Análisis mediante test enzimático

El análisis enzimático se conoce desde mediados del siglo XIX. Sin embargo, su aplicación rutinaria no fue posible hasta que los enzimas, coenzimas y metabolitos pudieron ser aislados y purificados. Todos los compuestos susceptibles de ser transformados por enzimas pueden ser determinadas enzimáticamente.

Son muchos los componentes del vino que pueden ser determinados enzimáticamente: ácidos málico, acético, pirúvico, ascórbico y cítrico; glicerol, glucosa, fructosa, calcio, acetaldehído, amoníaco, nitratos, etanol, etc.

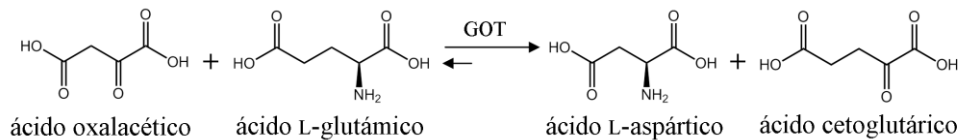
#### 3.3.1. Análisis del ácido málico

El análisis enzimático del ácido málico se basa en que el ácido L-málico es oxidado por el enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) en presencia de nicotinamida adenin dinucleótido en su forma oxidada ( $\text{NAD}^+$ ), al ácido oxalacético (Figura 3.21).



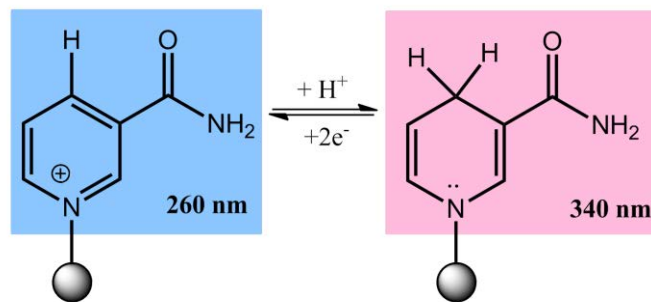
**Figura 3.21.** Reacción de oxidación del ácido málico.

Esta reacción está fuertemente desplazada hacia el ácido málico, pero si se elimina el ácido oxalacético del sistema de reacción, el equilibrio se desplaza hacia la derecha. El ácido oxalacético se convierte en ácido L-aspártico por la acción del enzima oxalacetato transaminasa (GOT) y en presencia del ácido L-glutámico (Figura 3.22).



**Figura 3.22.** Reacción de eliminación del ácido oxalacético.

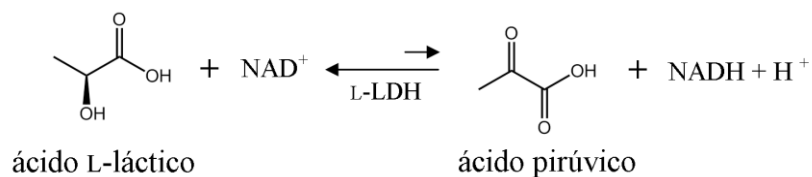
La cantidad de NADH formada es estequiométricamente igual a la concentración de ácido L-málico. Así, en el análisis se determina el NADH formado midiendo su absorbancia a 340 nm (Figura 3.23).



**Figura 3.23.** Reacción de transformación del  $\text{NAD}^+$  en NADH.

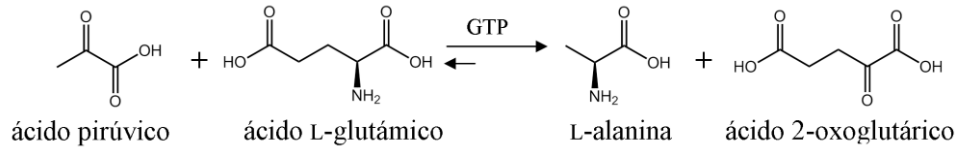
### 3.3.2. Análisis del ácido láctico

El análisis del ácido láctico mediante test enzimático se basa en la oxidación del ácido L-láctico por la  $\text{NAD}^+$  en presencia del enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) al ácido pirúvico (Figura 3.24).



**Figura 3.24.** Mecanismo de oxidación del ácido láctico.

El equilibrio está totalmente desplazado hacia el ácido L-láctico. Sin embargo, si se hace reaccionar el ácido pirúvico con el ácido L-glutámico en presencia de la glutamato piruvato transaminasa (GTP), el equilibrio se desplaza hacia el consumo del ácido L-láctico y la formación de NADH (Figura 3.25).



**Figura 3.25.** Mecanismo de eliminación del ácido pirúvico.

### 3.4. Métodos quimiométricos

#### 3.4.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales, conocido por sus siglas en inglés PCA, es una técnica de clasificación no supervisada que condensa la información dada por una serie de variables (concentraciones, ppm del espectro...) normalmente correlacionadas, en un número más restringido de variables fundamentales independientes (variables latentes).

Por lo tanto, al realizar un PCA lo que se busca es simplificar y reducir el número de variables de los datos originales, conservando la máxima información posible. Un número elevado de datos (variables discretas) puede ser explicado por un número muy pequeño de variables latentes. Las variables latentes o componentes principales, recogen toda o casi toda la varianza de los datos estudiados, dejando el ruido inherente de los datos en la matriz de residuales.

Los datos se ordenan en forma de matriz bidimensional ( $X=M \times N$ ), de modo que cada fila representa a las muestras estudiadas ( $M$  objetos), y las columnas contienen los valores obtenidos experimentalmente ( $N$  variables) (Figura 3.26).<sup>9</sup>

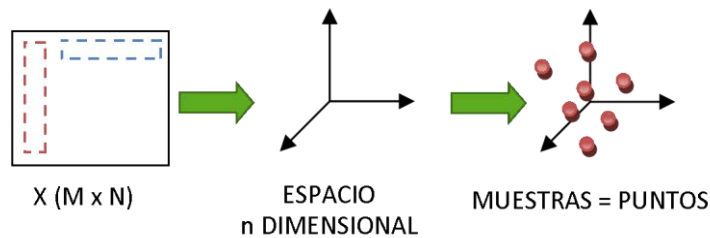
---

<sup>9</sup> Kramer, R. *Chemometric techniques for quantitative analysis*, Marcel Dekker, 1998.

		VARIABLES				
		pH	g/L	ppm	-----	n
MUESTRAS						
m1		C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	-----	C <sub>1n</sub>
m2		C <sub>21</sub>	C <sub>22</sub>	C <sub>23</sub>	-----	C <sub>2n</sub>
m3		C <sub>31</sub>	C <sub>32</sub>	C <sub>33</sub>	-----	C <sub>3n</sub>
m4		C <sub>41</sub>	C <sub>42</sub>	C <sub>43</sub>	-----	C <sub>4n</sub>
m5		C <sub>51</sub>	C <sub>52</sub>	C <sub>53</sub>	-----	C <sub>5n</sub>
⋮		⋮	⋮	⋮		⋮
m		C <sub>m1</sub>	C <sub>m2</sub>	C <sub>m3</sub>	-----	C <sub>mn</sub>

**Figura 3.26.** Matriz X de los datos bidimensional.

A la hora de realizar un PCA, se siguen ciertos pasos hasta que se obtiene la representación de los resultados. En primer lugar, el PCA reorganiza la matriz X, representando los datos en un nuevo espacio n-dimensional, en el que cada eje corresponde a una variable (espacio de las variables). Después, representa cada muestra como un punto en el nuevo espacio y empieza a buscar las variables latentes (Figura 3.27).

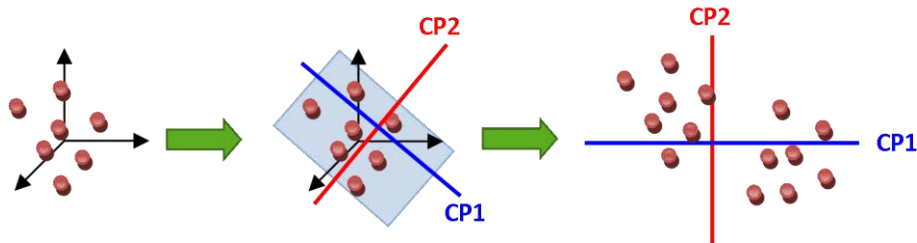


**Figura 3.27.** Representación de X en el nuevo espacio n-dimensional.

Las variables latentes o componentes principales (CP) se buscan en función de la dirección de máxima variabilidad de los datos. La CP1 es la componente que



más variabilidad explica, después la CP2, y así sucesivamente hasta que entre todas las componentes se explique la mayor parte de la variabilidad de los datos. Como máximo habrá tantas componentes como la menor dimensión de la matriz  $X$ . Las CP son ortogonales entre sí y todas pasan por el origen de coordenadas del espacio  $n$ -dimensional (Figura 3.28).



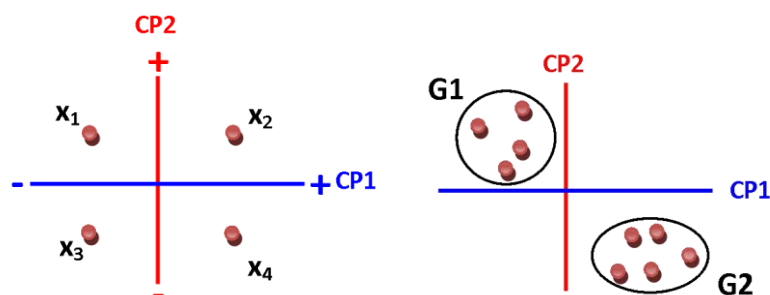
**Figura 3.28.** Representación gráfica del nuevo espacio delimitado por las CP.

El origen de coordenadas puede ser calculado de varias maneras en función de los datos de estudio. Entre ellas se encuentra el escalado automático (*auto scaling*), el centrado (*mean center*) que utiliza un promedio de los objetos y *pareto scaling* que es un intermedio entre los otros dos, disminuyendo la influencia de las señales con alta intensidad.

Se denominan *scores* a las distancias de las muestras a los nuevos ejes, y su representación gráfica se conoce como *score plot*. Los *loadings* son las relaciones entre los ejes en el espacio de variables y los nuevos ejes en las CP.

Para interpretar un PCA hay que tener en cuenta que los *scores* o coordenadas de las muestras nos indican la correlación entre dicha muestra y la CP. De este modo, la muestra  $x_1$  (Figura 3.29 a) está positivamente correlacionada con la CP2 y negativamente con la CP1. Por el contrario la  $x_4$  está correlacionada positivamente con la CP1 y negativamente con la CP2. La  $x_2$  está positivamente correlacionada

con las CP1 y CP2 y por último la  $x_3$  está correlacionada negativamente con las CP1 y CP2.<sup>10</sup>



**Figura 3.29.** Interpretación de un *score plot* a) correlaciones con los ejes y b) clasificación de muestras en base a las correlaciones.

Basándose en la semejanza en cuanto a las correlaciones de las muestras, éstas pueden ser clasificadas en grupos, como se representa en la Figura 3.29 b. De este modo, el PCA es una técnica de clasificación de datos no supervisada muy utilizada.

Para realizar un PCA sobre datos puntuales (concentraciones, pH...) extraídos de un RMN de protón, se utilizó el programa SPSS, pero a la hora de hacerlo con espectros completos de RMN, se utilizó el programa LatentiX, que de un modo bastante sencillo da la posibilidad de hacer tanto PCA como regresión de mínimos cuadrados parciales abreviado como PLS (*Partial Least Squares*).

<sup>10</sup> Miller, J. N.; Miller J. C. *Estadística y quimiometría para química analítica* Pearson Educación 2002.

### 3.4.2. Análisis de variables canónicas extendidas (ECVA) y de intervalos (iECVA)

Un problema del análisis de componentes principales es que a la hora de clasificar las muestras los componentes empleados podrían no ser necesariamente relevantes para la discriminación. Es por ello por lo que se extendió el estudio quimiométrico a técnicas más avanzadas como el análisis de variables canónicas extendidas (ECVA).

El análisis de correlación canónica (CVA) es un método de análisis multivariante cuyo objetivo es buscar las relaciones que pueda haber entre dos grupos de variables y la validez de las mismas, estimando las direcciones en el espacio que maximizan las diferencias entre ellas.<sup>11</sup> La correlación canónica es una correlación lineal y, por tanto, sólo busca relaciones lineales entre las variables. Pero sólo puede ser aplicado sobre conjuntos de muestras que no posean una alta colinealidad, como es el caso de los datos espectroscópicos.

Con fin de eliminar el problema de colinealidad existente a la hora de trabajar con datos espectroscópicos, como es el caso del RMN, se empleó el análisis de variables canónicas extendidas (ECVA).<sup>12</sup>

ECVA es una nueva herramienta de clasificación quimiométrica, la cual representa un nuevo enfoque para la agrupación de muestras basada en el análisis de correlación canónica y se modificó para poder trabajar con datos multivariados de covarianza, utilizando un motor de PLS subyacente.<sup>13</sup> Dicha técnica es capaz de producir separaciones de gran alcance a partir de varias clases diferentes de datos.

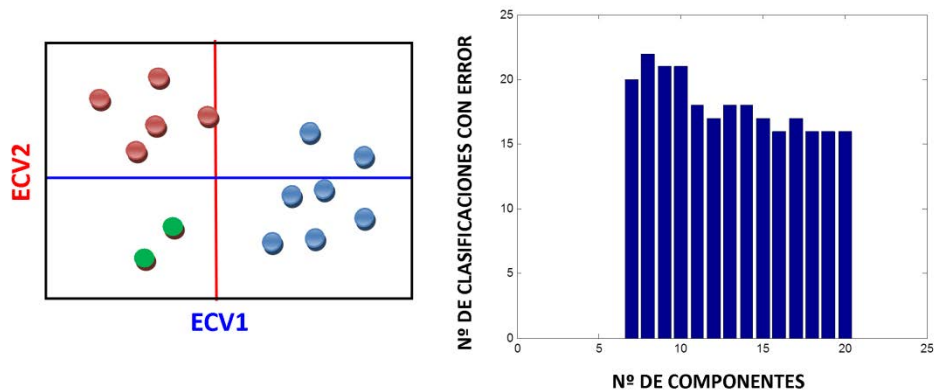
---

<sup>11</sup> Nørgaard, L.; Bro, R.; Westad, F.; Engelsen, S. B., *J. Chemom.* **2006**, *20*, 425–435.

<sup>12</sup> Nørgaard, L.; Sólétormos, G.; Harrit, N.; Albrechtsen, M.; Olsen, O.; Nielsen, D.; Kampmann, K.; Bro, R. *J. Chemom.* **2007**, *21*, 451–458.

<sup>13</sup> Winning, H.; Roldán-Marín, E.; Dragsted, L. O.; Viereck, N.; Poulsen, M.; Sánchez-Moreno, C.; Cano, M. P.; Engelsen, S. B. *Analyst* **2009**, *134*, 2344–2351.

La presentación de los resultados se realiza mediante un gráfico de dos dimensiones (Figura 3.30), donde se observan los diferentes grupos de datos obtenidos de las dos direcciones de máxima diferenciación entre ellas. Este tipo de gráfico es calculado empleando un determinado número de componentes, que es elegido no sólo por ser máxima la diferenciación, sino también por ser mínimo el error cometido al realizar la clasificación. Estas herramientas supervisan los resultados contemplando el error que lleva asignado un determinado modelo de clasificación.



**Figura 3.30.** a) Representación gráfica del ECVA y b) gráfico de relación de números de componentes y el número de clasificaciones con error.

El porcentaje de error cometido al clasificar un determinado grupo de datos es el valor obtenido de:

$$Error = \frac{\text{número de clasificaciones con error}}{\text{número de las muestras}} \cdot 100.$$

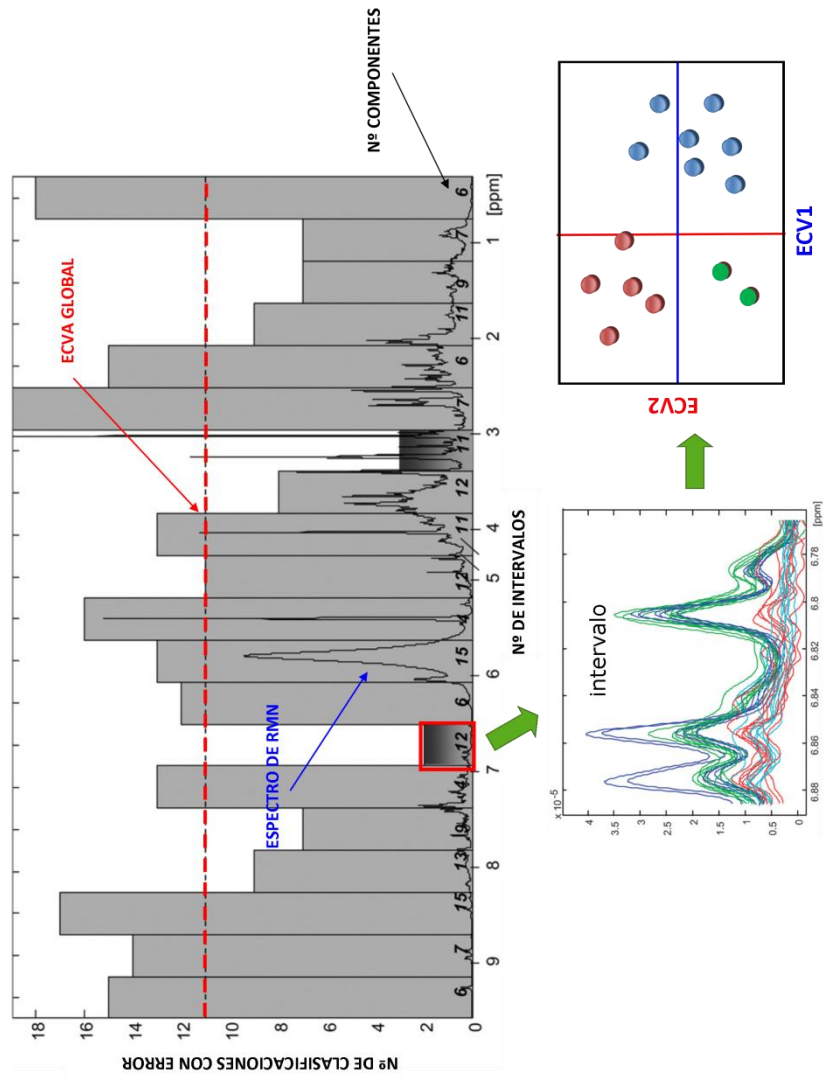
Por otro lado, iECVA es una extensión del concepto de iPLS a ECVA, diseñado para proporcionar información significativa acerca de qué regiones espectrales tienen la relevancia principal responsable de la separación entre los grupos. El conjunto de datos se divide en un número determinado de segmentos de igual

tamaño, que varía en función del tamaño y la información recogida en los espectros. Esta segmentación no conduce a una reducción de datos, como hace el *binning*,<sup>14</sup> sino que proporciona una visión general de la información relevante en diferentes subdivisiones espectrales.

Así, se obtiene un espectro de RMN promedio de todas las muestras, subdividido en el número de intervalos fijado, en el que se ve también el número de componentes y el número de clasificaciones con error empleado en cada intervalo para calcular su ECVA (Figura 3.31). En la misma figura aparece una línea roja que representa el número de clasificaciones con error que se obtiene al calcular el modelo de ECVA global de los datos.

---

<sup>14</sup> El *binning* espectral es una técnica empleada para reducir los datos del espectro de manera eficiente y así prepararlos para un posterior análisis multivariante.



**Figura 3.31.** Espectro de RMN subdivido para calcular el ECVA para cada intervalo y su interpretación.

## Capítulo 4

# Evolución y cuantificación de metabolitos del vino empleando la resonancia magnética nuclear

### 4.1. Introducción y antecedentes

### 4.2. Puesta a punto del método

*4.2.1. Cuantificación de ácido málico y ácido láctico*

### 4.3. Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de la elaboración de un vino joven de la D.O.Ca. Rioja

*4.3.1. Cuantificación de otros compuestos mediante patrón externo*

*4.3.2. Cuantificación de otros compuestos mediante otros métodos*

*4.3.3. Cuantificación automática de otros compuestos en muestras de vino. Comparación con el método de infrarrojo*

### 4.4. Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de polifenoles durante la elaboración de un vino crianza de la D.O.Ca. Rioja

*4.4.1. Cuantificación de polifenoles mediante patrón externo*

*4.4.2. Seguimiento de los polifenoles y de otros compuestos durante la elaboración de un vino crianza*

### 4.5. Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN





## 4.1 Introducción y antecedentes

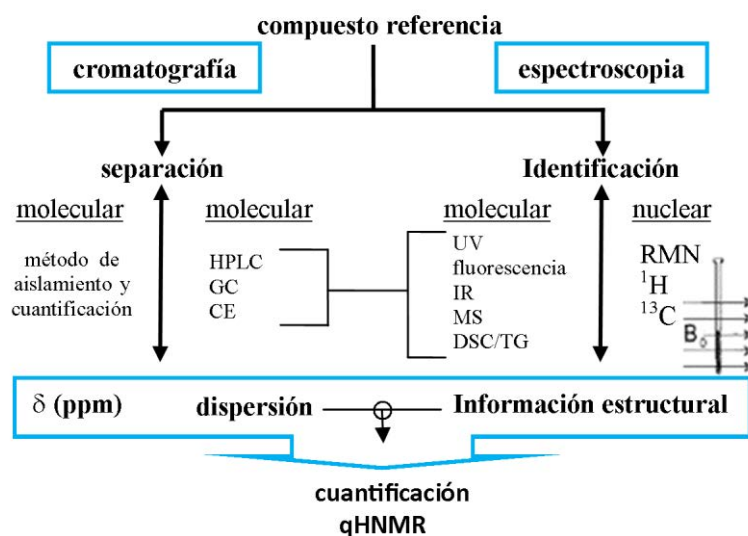
El empleo de la RMN para cuantificar metabolitos en matrices complejas como el vino es bastante reciente. Las limitaciones de sensibilidad y reproducibilidad de esta técnica han ido disminuyendo con los avances informáticos y los potentes imanes de los que se dispone en la actualidad. Ahora la RMN se presenta como una potente herramienta, no sólo a nivel estructural, sino también como técnica analítica.

Como ocurre con cualquier técnica nueva, los primeros estudios que se realizaron fueron para validarla frente a otras de reputación conocida. Pauli y sus colaboradores<sup>1</sup> fueron los que bautizaron a esta técnica como qHNMR, abreviación de “*proton-specific quantitative nuclear magnetic resonance*”. En diversos estudios se ha validado la cuantificación mediante RMN<sup>2</sup> tomando muestras de referencia analizadas por diversas técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC), del modo mostrado en la Figura 4.1.

---

<sup>1</sup> Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 133–149.

<sup>2</sup> Malz, Z.; Jancke, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 813–823.



**Figura 4.1.** Esquema de validación de la RMN cuantitativa empleando patrones de referencia. (IR, infrarrojo; UV, ultravioleta; MS, espectrometría de masas; DSC/TG, calorimetría diferencial de barrido y termogravimetría; CE, electroforesis capilar).

Maniara y colaboradores<sup>3</sup> presentaron una publicación de gran interés elaborando un exhaustivo protocolo de trabajo. En él se demostró la excelente reproducibilidad de la RMN cuantitativa, analizando varias veces una misma muestra y la precisión mediante el análisis de la varianza (ANOVA).

También se ha demostrado que es un método robusto, que no sufre efectos significativos en términos de variación de instrumentación, campo magnético, ni en los parámetros experimentales utilizados.<sup>4</sup> Una característica importante para esta técnica es que con una simple integración de señales no solapadas se obtiene un método de cuantificación<sup>5</sup> muy correcto y robusto que puede competir con técnicas tan estudiadas y valoradas como la cromatografía líquida de alta resolución.

<sup>3</sup> Maniara, G.; Rajamoorthi, K.; Rajan, S.; Stockton, G. W. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4921–4928.

<sup>4</sup> Nord, L. I.; Vaag, P.; Duus, J. Ø. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4790–4798.

<sup>5</sup> Al Deen, T. S.; Hibbert, D. B.; Hook, J. M.; Wells, R. J. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *474*, 125–135.

Con estos avances y viendo sus posibilidades, era de esperar que se comenzara a emplear como una técnica analítica más y se comenzaron a registrar espectros de alimentos<sup>6</sup> y de productos agrícolas.<sup>7</sup> Así, comenzaron a aparecer estudios en los que se analizaban ácidos orgánicos y aminoácidos en cerveza,<sup>8</sup> se cuantificaban de compuestos como el ácido clorogénico,<sup>9</sup> la (-)-epicatequina,<sup>10</sup> el ácido fórmico en sidra,<sup>11</sup> los ácidos málico y cítrico en zumos de fruta<sup>12</sup> y los principales ácidos orgánicos en vinagres.<sup>13</sup>

De todos éstos, cabe destacar el trabajo realizado por Duus y sus colaboradores<sup>4</sup> en el estudio de los aminoácidos y los ácidos orgánicos en cerveza. Utilizaron como patrón interno el ácido acético deuterado, y validaron su método tanto con cromatografía líquida de alta resolución como con electroforesis capilar, obteniendo fantásticos resultados.

Dentro de los alimentos, el vino se sitúa como una de las bebidas más importantes en el mercado. Éste está constituido por numerosos compuestos presentes en diferentes concentraciones, siendo los mayoritarios: agua, etanol, glicerol, azúcares y ácidos orgánicos.

Un punto importante a la hora de cuantificar diferentes compuestos mediante la RMN es la simplicidad del tratamiento de la muestra. Con la simple adición de un disolvente deuterado se puede registrar un espectro de vino y obtener la

---

<sup>6</sup> Cordella, C.; Moussa, I.; Martel, A. C.; Sbirrazzuoli, N.; Lizzani-Cuvelier, L. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1751–1764.

<sup>7</sup> Dixon, R. A.; Gang, D. R.; Charlton, A. J.; Fiehn, O.; Kuiper, H. A.; Reynolds, T. L.; Tjeerdema, R. S.; Jeffery, E. H.; German, J. B.; Ridley, W. P.; Seiber, J. N. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8984–8994.

<sup>8</sup> Almeida, C.; Duarte, I. F.; Barros, A.; Rodrigues, J.; Spraul, M.; Gil, A. M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 700–706.

<sup>9</sup> Berregi, I.; Santos, J. I.; del Campo, G.; Miranda, J. I.; Aizpurua, J. M. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *486*, 269–274.

<sup>10</sup> Berregi, I.; Santos, J. I.; del Campo, G.; Miranda, J. I. *Talanta* **2003**, *61*, 139–145.

<sup>11</sup> Berregi, I.; del Campo, G.; Caracena, R.; Miranda, J. I. *Talanta* **2007**, *72*, 1049–1053.

<sup>12</sup> del Campo, G.; Berregi, I.; Caracena, R.; Santos, J. I. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 462–468.

<sup>13</sup> Caligiani, A.; Acquotti, D.; Palla, G.; Bocchi, V. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *585*, 110–119.

información cuantitativa para el compuesto en cuestión. De este modo se eliminan todos los tratamientos previos que otras técnicas como HPLC o GC requieren (preconcentración, derivatización...).

## 4.2 Puesta a punto del método

### 4.2.1 Cuantificación de ácido málico y ácido láctico

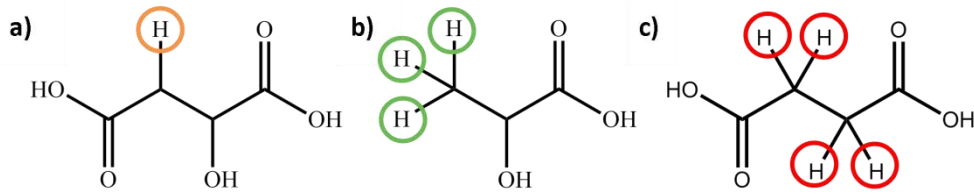
Para la comprobación del buen funcionamiento del método se decidió, en primer lugar, realizar la cuantificación de algún compuesto de fácil medición por otra técnica. Considerando la importancia que posee la determinación de los ácidos málico y láctico a la hora de elaborar un buen vino,<sup>14</sup> pareció interesante estudiar el proceso en el que se encuentran inmersos: la fermentación maloláctica. Valores bajos de ácido málico conceden características organolépticas buscadas en un vino tinto como es la suavidad en la acidez, siendo recomendados valores inferiores a 0.5 g/L. Esta característica también toma importancia en otros tipos de vino como son el blanco y el rosado. En este caso, las cantidades buscadas son intermedias para no perder el frescor que les concede el ácido málico.

Como hemos visto en la introducción, la fermentación maloláctica tiene lugar gracias al metabolismo de las bacterias lácticas, que suelen crecer de manera espontánea en los vinos. En muchos casos, se desarrollan al final de la fermentación alcohólica, conviviendo ambos procesos durante algunas horas, pero alcanzando su momento de máxima actividad una vez finalizada la fermentación alcohólica.

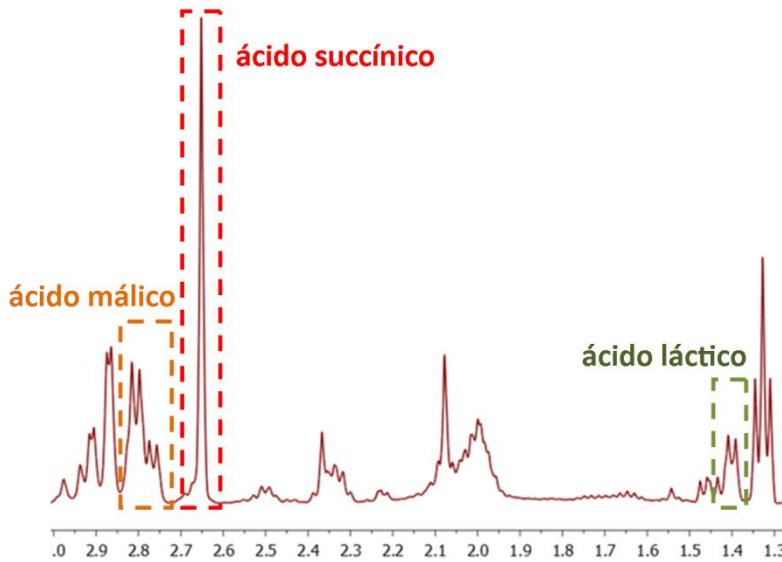
Así decidimos abordar el análisis de los ácidos málico y láctico durante la evolución del vino, desde su entrada en bodega hasta la finalización de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Para ello, empleamos el método de la cuantificación mediante RMN de protón con patrón externo (Capítulo 3, sección 3.1.3).

---

<sup>14</sup> Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. *Handbook of Enology Volume 2; The microbiology of wine and vinifications 2<sup>nd</sup> Edition*, John Wiley and Sons, Ltd, 2006.



**Figura 4.2.** a) Ácido málico, b) ácido láctico, c) ácido succínico.



**Figura 4.3.** Señales de los ácidos málico, láctico y succínico en un espectro de RMN de protón de vino. **Naranja**, señal de ácido málico integrada; **verde**, señal de ácido láctico integrada y **rojo**, señal del ácido succínico integrada y empleada como patrón interno.

Se analizó un protón diastereotópico del ácido málico, cuya señal en el espectro es una señal en forma de doblete de dobletes ( $^3J=8.0$  Hz,  $^3J=16.4$  Hz) a 2.83 ppm (Figura 4.2 a). En el ácido láctico se analizó el grupo metilo (Figura 4.2 b), cuyos tres protones generan un doblete ( $^3J=6.9$  Hz) a 1.40 ppm, como se puede observar en la Figura 4.3.

Existen más señales de los ácidos málico y láctico correspondientes a otros protones, pero las regiones en el espectro donde se encuentran son menos claras

que las mencionadas anteriormente y habitualmente se encuentran solapadas con señales de otros compuestos presentes en el vino.

Se realizaron varios experimentos con el fin de evaluar la reproducibilidad de las constantes calculadas (Capítulo 3, sección 3.1.3), de manera que los valores obtenidos para cada compuesto son las siguientes:

	ácido málico	ácido láctico
$k_1$	0.982	0.963

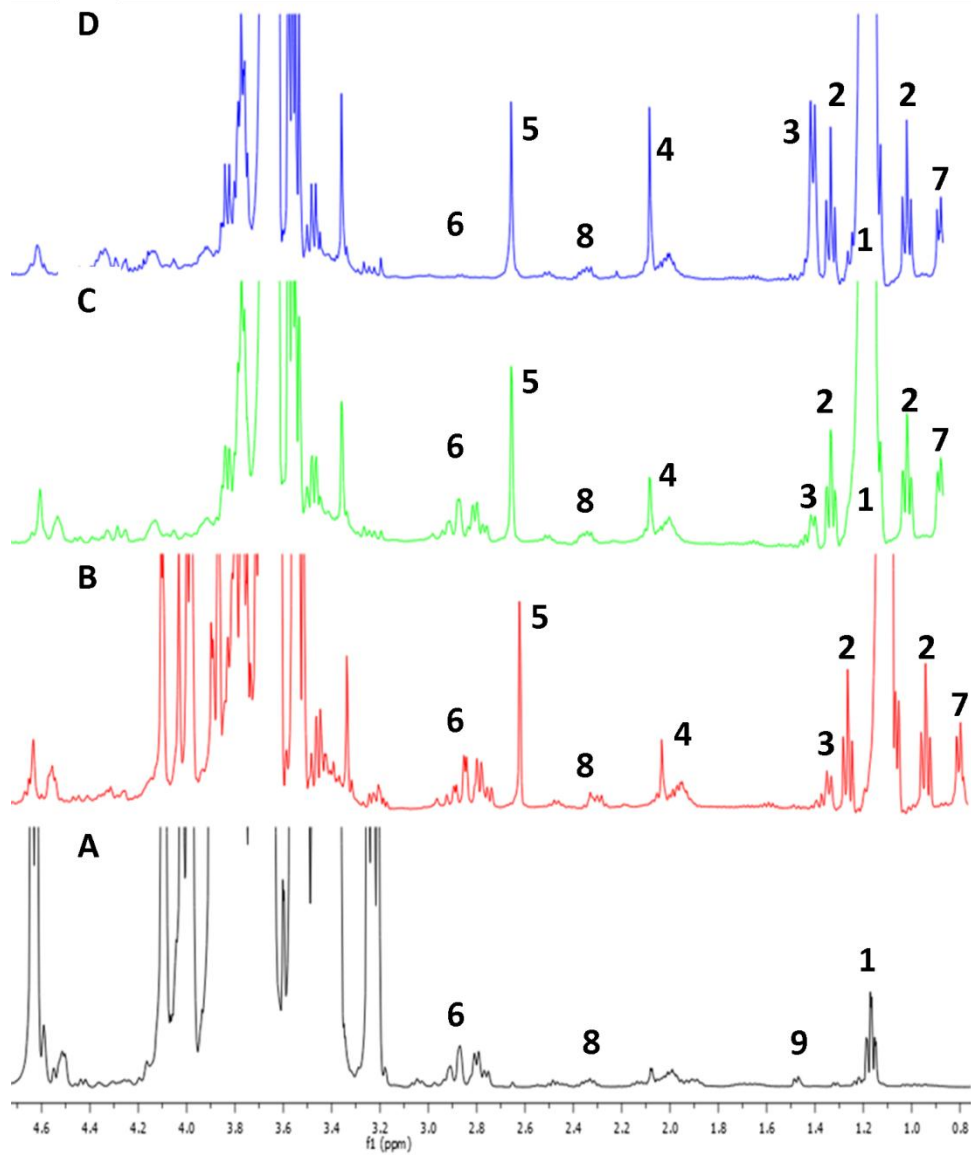
El efecto matriz de la muestra se evaluó añadiendo cantidades conocidas de ácido málico y ácido láctico a un mosto. Tanto el mosto original como el enriquecido se procesaron del mismo modo y bajo las mismas condiciones. Se añadieron 11 mg de ácido málico (0.082 mmol) a 1 mL de una muestra que contenía 0.026 mmol de ácido málico, obteniéndose un resultado global correspondiente a 0.11 mmol/mL, por lo que no se encontró efecto matriz. Además, estos ensayos se realizaron con el resto de los analitos, lo cual nos permitió asignar de forma inequívoca las señales a los correspondientes compuestos.

La puesta a punto del método de cuantificación se realizó empleando muestras de mosto y vino de la uva tinta de variedad Tempranillo, cultivada en Tudelilla (La Rioja) y procedentes de la Bodega Dinastía Vivanco. Se adicionaron levaduras y bacterias lácticas seleccionadas a partir de preparados comerciales, para ayudar a la iniciación de las fermentaciones alcohólica y maloláctica.

Todas las muestras recogidas se mantuvieron a -25 °C hasta el momento de ser analizadas. Para realizar los análisis se descongelaron, se ajustó el pH de las muestras a 3 y se les añadió a cada una D<sub>2</sub>O con TSP en una relación final H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O de 9:1. Posteriormente, mediante el programa de pulsos expuesto en la parte experimental se registraron los espectros de RMN de protón.

La evolución del proceso de elaboración del vino se siguió mediante la RMN de protón. En la Figura 4.4, se pueden observar los espectros recogidos para los días 3 y 13 que representan la evolución de la fermentación alcohólica (espectros **A** y **B**) y los días 45 y 69 que representan la evolución de la fermentación maloláctica (espectros **C** y **D**). En el espectro **A**, que representa la muestra de mosto, se puede observar que los compuestos predominantes son los azúcares, tanto fructosa como glucosa, ácido málico, varios aminoácidos y una pequeña cantidad de etanol que refleja el comienzo de la fermentación alcohólica. En el espectro **B** (día 13), la cantidad de etanol ha aumentado considerablemente debido al proceso de transformación de los azúcares en etanol, efectuado por las levaduras. Aún en este espectro se puede observar una cierta cantidad de azúcares, todavía no consumidos. También durante este proceso se genera una cantidad considerable de ácido acético. Después de 45 días (espectro **C**), la fermentación alcohólica ya ha llegado a su fin y la cantidad de etanol es máxima, así como la cantidad de ácido succínico y de ácido acético, que se mantendrán constantes hasta el final del proceso.





**Figura 4.4.** Evolución de las fermentaciones alcohólica y maloláctica mediante RMN de protón (400 MHz). Picos: **1**, etanol; **2**, satélites de etanol; **3**, ácido láctico; **4**, ácido acético; **5**, ácido succínico; **6**, ácido málico; **7**, 2,3-butanodiol; **8**, prolina; **9**, alanina.

En este espectro también se puede observar una pequeña cantidad de azúcares no consumidos durante la fermentación. Son los hidratos de carbono no consumibles por las levaduras, conocidos con el nombre de azúcares reductores, que engloban principalmente a los azúcares de cinco carbonos (pentosas) tales como la maltosa y la lactosa, aunque generalmente también queda una pequeña cantidad de glucosa y fructosa residual. En este momento (espectro **C**, día 45), la fermentación maloláctica ya ha comenzado, generándose ácido láctico a partir de ácido málico; pero será en el día 69 (espectro **D**) en el que se podrá considerar que ha llegado a su fin. Entonces la señal del ácido málico ha desaparecido casi completamente y la del ácido láctico ha alcanzado la máxima concentración posible a partir del ácido málico, vía fermentación maloláctica.

Otros compuestos que se pueden observar a lo largo de las diferentes etapas son prolina, alanina, ácido tartárico, glicerol, 2,3-butanodiol y otros compuestos más minoritarios, tales como la leucina y la isoleucina. Los desplazamientos químicos de cada compuesto corresponden con los datos recogidos en la bibliografía.<sup>15</sup>

Una manera muy visual de seguir el curso de la fermentación maloláctica es el seguimiento del consumo, por parte de las bacterias lácticas, del ácido málico para generar el ácido láctico. En la Figura 4.5 se representa la evolución de la fermentación maloláctica expresada en términos de concentración (mol/L) de ácido málico consumido y ácido láctico formado, medidas mediante RMN. En la misma figura, de color verde, también se muestran las concentraciones obtenidas mediante el análisis por el método enzimático realizado por la bodega. En la Tabla 4.1 se observan los valores representados en la Figura 4.5, expresados en mol/L.

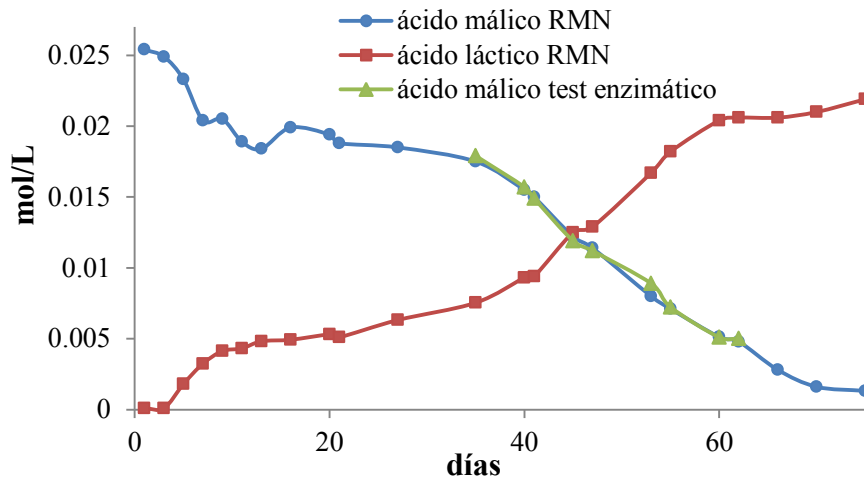
---

<sup>15</sup> Al Deen, T. S.; Hibbert, D. B.; Hook, J. M.; Wells, R. J. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 474, 125–135.

**Tabla 4.1.** Resumen de datos expresados en mol/L.

días	ácido málico	ácido láctico	bodega ácido málico
1	0.0254	1.00E-04	--
3	0.0249	1.00E-04	--
5	0.0233	0.00181	--
7	0.0204	0.00324	--
9	0.0205	0.00413	--
11	0.0189	0.00432	--
13	0.0184	0.00482	--
16	0.0199	0.00493	--
20	0.0194	0.00530	--
21	0.0188	0.00511	--
27	0.0185	0.00632	--
35	0.0175	0.00754	0.0179
40	0.0155	0.00931	0.0157
41	0.0150	0.00940	0.0149
45	0.0122	0.0125	0.0119
47	0.0114	0.0129	0.0112
53	0.00800	0.0167	0.00890
55	0.00711	0.0182	0.00723
60	0.00512	0.0204	0.00510
62	0.00480	0.0206	0.00502
66	0.00281	0.0206	--
70	0.00161	0.0210	--
75	0.00132	0.0219	--

La fermentación se dio por concluida en 45 días, obteniéndose una concentración de ácido láctico idéntica a la concentración inicial de ácido málico, tal y como se visualiza en la Figura 4.5.

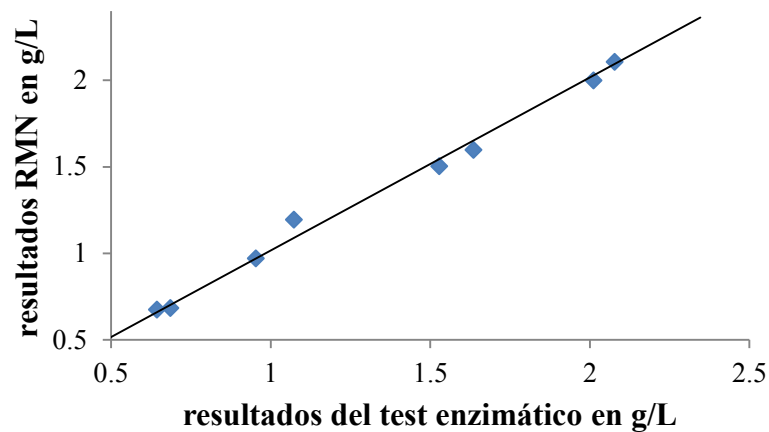


**Figura 4.5.** Evolución de los ácidos málico (azul) y láctico (rojo) mediante espectroscopia de RMN de protón y test enzimático (verde) en vino tinto de Tudelilla.

En la figura se puede observar como las 9 medidas obtenidas mediante el test enzimático, por parte de la bodega, se ajustan perfectamente a las 9 medidas obtenidas mediante la RMN cuantitativa.

Para corroborarlo, en la Figura 4.6 se representa la línea de regresión que enfrenta ambos métodos en términos de gramos por litro, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$C_{\text{RMN}} = (0.0198 \pm 0.046) + (0.9965 \pm 0.029) C_{\text{enzimático}} \text{ con } R=0.9969$$

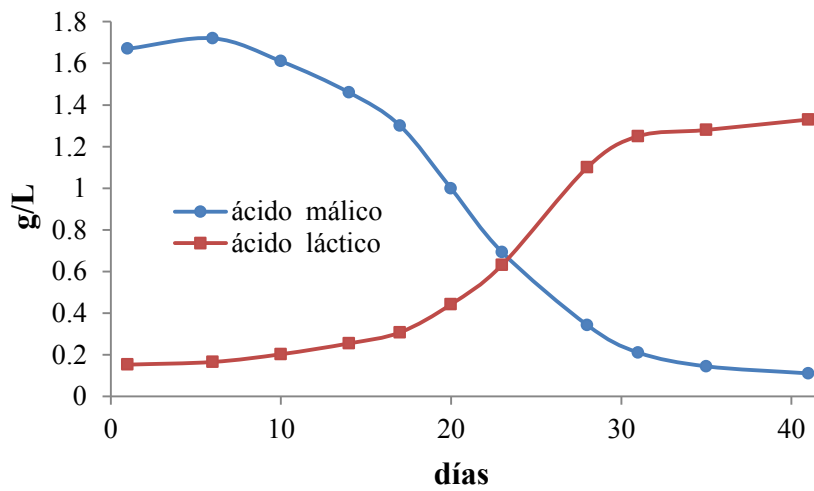


**Figura 4.6.** Concentración de ácido málico determinado mediante la RMN cuantitativa (400 MHz para protón) frente a la concentración determinada mediante test enzimático.

Del mismo modo, se ilustra en la Figura 4.7 el curso de la fermentación maloláctica realizada por otro vino de variedad Garnacha. La fermentación alcohólica fue realizada en la bodega y la fermentación maloláctica tuvo lugar dentro de botellas en un baño termostático. Al igual que en el caso anterior, se observa perfectamente la evolución de la fermentación maloláctica, en este caso en términos de gramos por litro de ácido málico consumido y ácido láctico formado. En la Figura 4.7 se muestran los valores en g/L obtenidos mediante el método de RMN y en la Tabla 4.2 se muestran los datos representados en la gráfica a modo de tabla.

**Tabla 4.2.** Resumen de datos expresados en g/L.

días	ácido málico	ácido láctico
1	1.67	0.153
6	1.72	0.166
10	1.61	0.203
14	1.46	0.255
17	1.30	0.308
20	0.999	0.443
23	0.693	0.632
28	0.343	1.10
31	0.211	1.25
35	0.145	1.28
41	0.111	1.33

**Figura 4.7.** Evolución de los ácidos málico y láctico mediante espectroscopia de RMN de protón en un vino tinto de Tudelilla.

### 4.3 Aplicación de la metodología al seguimiento de la elaboración de un vino joven de la D.O.Ca. Rioja

#### 4.3.1. Cuantificación de otros compuestos mediante patrón externo

Como se ha podido observar en el apartado anterior, la espectroscopia de RMN permite, de manera simultánea, estudiar la evolución de los ácidos málico y láctico a lo largo del desarrollo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica, con la simple adquisición del espectro de RMN de protón, usando la supresión de agua como método de adquisición y el método del patrón externo para la cuantificación.

Del mismo modo, se puede observar que un espectro de RMN de protón contiene importante información, tanto cualitativa como cuantitativa, de muchos otros compuestos presentes en el vino. Algunos de estos compuestos presentan señales no solapadas que permiten su cuantificación con relativa sencillez.

La ampliación del estudio anterior se centró ahora principalmente en los compuestos que poseían señales integrables en la zona del espectro comprendido entre 0.8 y 3.2 ppm. En la mayoría de los casos se cuantificaron empleando el método del patrón externo y algunos de ellos se compararon con los resultados obtenidos mediante rectas de calibrado y de forma puntual, con los del método de infrarrojo. En concreto, los compuestos estudiados fueron: etanol, los ácidos acético, málico, láctico y succínico, así como los aminoácidos alanina, prolina y la relación prolina/arginina. Algunos de estos compuestos aparecen en la ruta metabólica de la fermentación alcohólica (Capítulo 1).

Para la cuantificación de estos compuestos, con el fin de hacer un estudio en profundidad y un análisis de la versatilidad de esta metodología, se siguió la evolución de un depósito de uva tinta perteneciente a Bodegas Patrocinio S.C.L. (Figura 4.8), situada en Uruñuela y que forma parte de la D.O.Ca. Rioja.



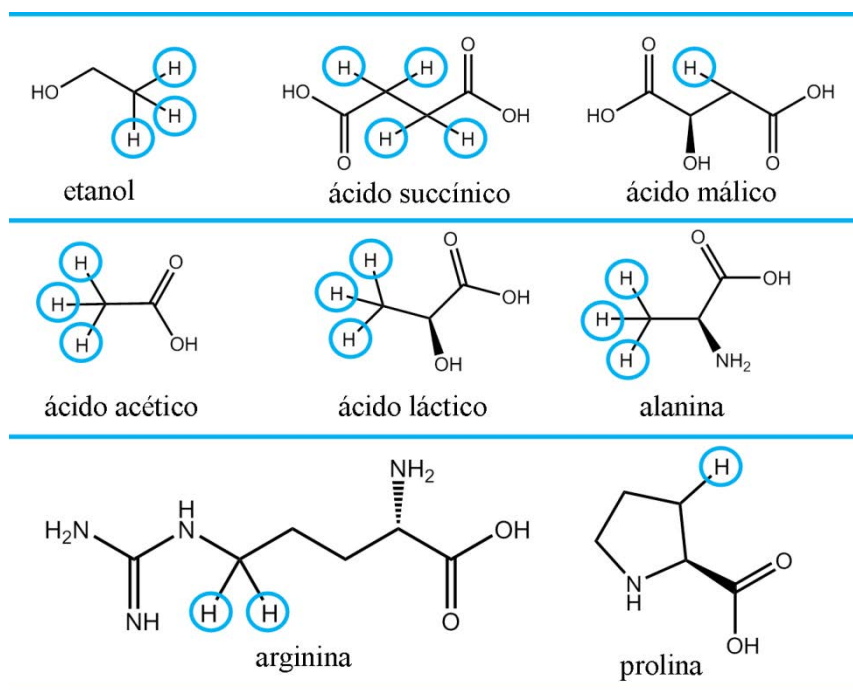
**Figura 4.8.** Bodega Patrocinio S.C.L., Uruñuela.

Como se ha comentado previamente, para la RMN cuantitativa es esencial la selección apropiada de los parámetros de procesado de los espectros, además de optimizar la integración de los señales.

La señal que se empleó en la cuantificación del etanol fue un grupo metilo, que se integró mediante dos métodos. El método A, integrando la señal principal (triplete,  $^3J=7.2$  Hz, 3H a 1.18 ppm, sin los satélites de carbono-13 y aplicando la correspondiente corrección) y el método B, integrando el satélite derecho correspondiente al acoplamiento del protón con el carbono-13 (triplete,  $^3J=7.2$  Hz, 3H a 1.01 ppm y aplicando el correspondiente factor de corrección).

Para el ácido láctico se integró un grupo metilo (doblete,  $^3J=6.9$  Hz, 3H a 1.40 ppm); para la alanina un grupo metilo (doblete,  $^3J=7.2$  Hz, 3H a 1.46 ppm); para la arginina un grupo  $\gamma$ -metileno (multiplete, 2H a 1.60-1.69 ppm); para el ácido acético un grupo metilo (singlete, 3H a 2.06 ppm); para la prolina un protón del grupo  $\beta$ -metileno (multiplete, 1H a 2.29-2.39 ppm); para el ácido succínico dos grupos metilenos (singlete, 4H a 2.65 ppm) y para el ácido málico, igual que en el capítulo 3.2.1., un protón diastereotópico (doblete de dobletes  $^3J=8.0$  Hz,  $^2J=16.4$  Hz, 1H a 2.83 ppm) (Figura 4.9).





**Figura 4.9.** Estructuras de los compuestos a analizar, identificando en cada una de ellas los protones integrados en un espectro de RMN de protón (400 MHz).

Se realizó el cálculo de las constantes mediante tres experimentos con el fin de evaluar la reproducibilidad de las mismas. Los valores, las constantes y las desviaciones estándar obtenidos para cada compuesto son los siguientes:

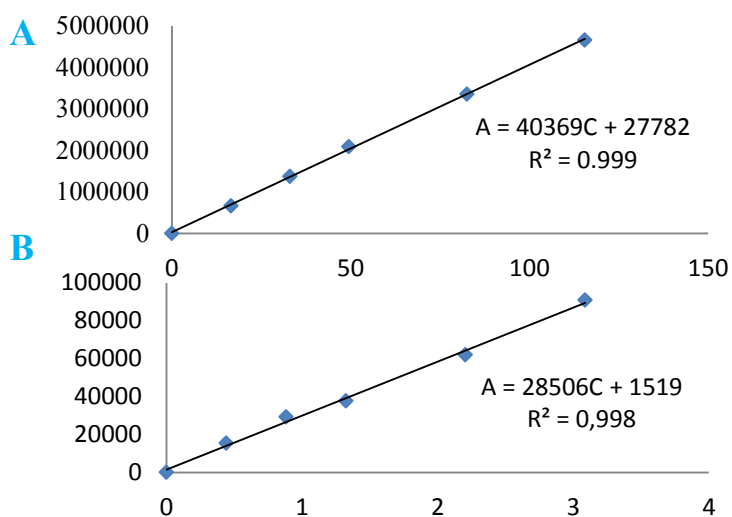
**Tabla 4.3.** Tabla resumen de las constantes que relacionan cada compuesto con el ácido succínico.

	etanol	etanol satélite	ácido acético	ácido málico	ácido láctico	ácido succínico	prolina	alanina
$k_1$	0.911	1.05	0.934	0.978	0.969	0.952	0.966	1.07
$\sigma$	0.019	0.10	0.091	0.028	0.033	0.051	0.018	0.13

#### 4.3.2. Cuantificación de otros compuestos mediante otros métodos

Para validar los resultados obtenidos mediante el método del patrón externo se realizaron rectas de calibrado para dos compuestos principales en el vino, como son el etanol y el ácido acético. Se prepararon cinco disoluciones de cantidad conocida, en el rango de concentraciones en el cual se encuentran presentes en el vino, y se distribuyeron en cinco tubos de RMN.

Del mismo modo que para el patrón externo, los experimentos se realizaron en las mismas condiciones que para la muestras de vino. Se repitieron tres veces para cada tubo. Estas rectas se muestran en la Figura 4.10 y poseen unos buenos coeficientes de determinación.



**Figura 4.10.a)** Recta de calibrado para el etanol (señal principal) (área absoluta *versus* C en g/L). **b)** Recta de calibrado para el ácido acético (área *versus* C en g/L).

#### 4.3.3. Cuantificación automática de otros compuestos en muestras de vino.

##### *Comparación con el método de infrarrojo*

Un depósito de Bodegas Patrocinio S.C.L se llenó con uva tinta de variedad Tempranillo despalillada y estrujada. La composición del mosto, medida mediante técnicas de infrarrojo (Foss WineScane™ FT 120, Figura 4.11), fue la siguiente: azúcar (glucosa-fructosa), 223 g/L; acidez total, 4.17 g/L (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 6.10 g/L (ácido tartárico); pH, 3.47. El mosto se acondicionó de manera habitual adicionando sulfuroso gas como antiséptico y antimicrobiano, y levaduras para iniciar la fermentación alcohólica. Cuando la fermentación alcohólica finalizó (12 días después del comienzo), se descubó y se mezcló con otro depósito para realizar juntos la fermentación maloláctica.

La composición inicial del otro depósito fue la siguiente: azúcar (glucosa-fructosa), 230 g/L; acidez total, 4.21 g/L (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 6.20 g/L (ácido tartárico); pH, 3.56.



**Figura 4.11.** Foto del equipo de infrarrojo empleado, Foss WineScane™ FT 120.

Se recogieron 28 muestras durante 207 días y fueron tomadas directamente del depósito y guardadas a -25 °C hasta el momento de ser analizadas. Para realizar el análisis se descongelaron, se ajustó el pH a 3 y se introdujeron 0.45 mL en un tubo de RMN de 5 mm junto con 0.05 mL de D<sub>2</sub>O con TSP. Posteriormente, mediante el programa de pulsos expuesto en el capítulo 3, material y métodos, se obtuvieron

los espectros de RMN de protón, que permiten cuantificar en cada uno de ellos, de forma simultánea, los siguientes compuestos.

- **Cuantificación del etanol**

En el transcurso de la fermentación alcohólica se evaluó el proceso de formación del etanol,<sup>16</sup> compuesto más importante del vino después del agua y producto mayoritario de la fermentación alcohólica. El etanol de un vino viene expresado en términos de porcentaje de etanol por volumen de vino, denominado comúnmente como grado de un vino y expresado como v/v.

En este caso, para la cuantificación de la cantidad de etanol presente en el vino se emplearon 4 métodos diferentes que se contrastaron con los datos aportados por la bodega mediante técnicas de infrarrojo. En primer lugar, se aplicó el estándar externo a la señal principal (método **A**) y al satélite derecho de carbono-13 (método **B**). También se empleó la interpolación en la recta de calibrado sobre el pico principal (método **C**).

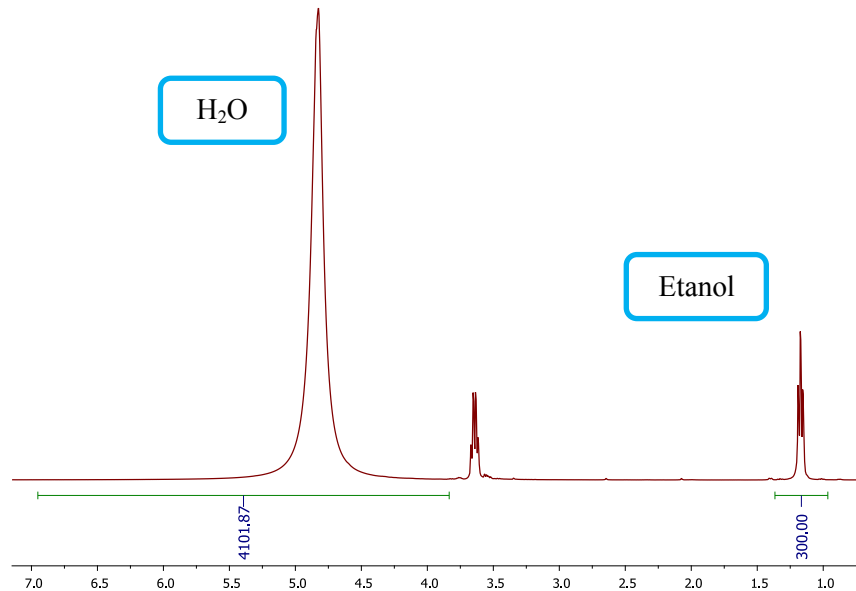
Todos los métodos anteriormente comentados se realizan sobre el mismo espectro ya registrado. Sin embargo, para el último método (método **D**), que se utilizó sólo en el caso de la cuantificación del etanol, se registró un espectro diferente. Este experimento permite la cuantificación del grado del etanol de un modo rápido,<sup>17</sup> mediante un experimento normal de RMN de protón directamente sobre la muestra, sin emplear ningún patrón de referencia y sin supresión de agua (Figura 4.12). El experimento se realizó con un programa de pulsos con un D1 de 5 s y comparando las integrales generadas por el agua y el etanol. En este caso, el área integrada para la señal de etanol fue la señal completa englobando tanto al pico principal como a los satélites.

---

<sup>16</sup> Margalit, Y. *Concepts in wine chemistry*. The wine appreciation guild Ltd, 1997.

<sup>17</sup> Berger, S.; Braun, S. 200 and more NMR experiments: A practical course Wiley-VCH, 2004.

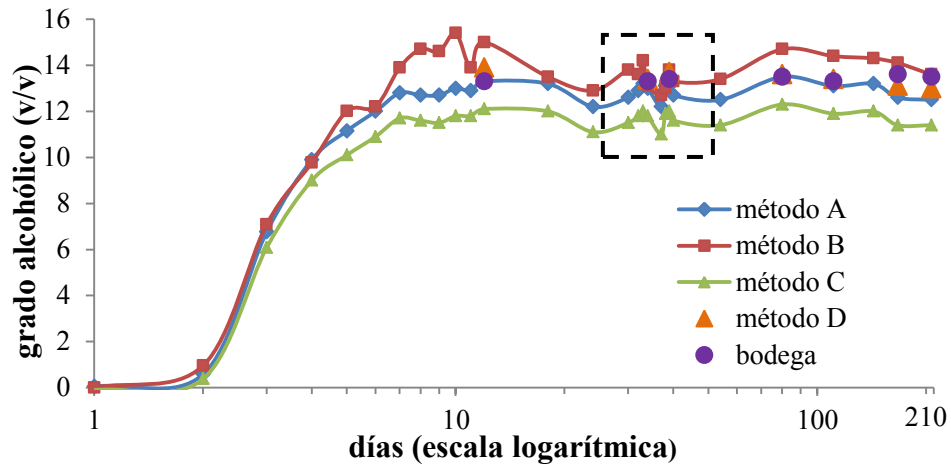
A los datos de las áreas (métodos **A**, **B** y **C**) se les aplicó un factor de corrección. En el caso del pico principal, este factor fue 100/98.9 para considerar el porcentaje de los satélites de carbono-13, y en el caso del satélite derecho, el factor fue 100/0.55 para considerar al otro satélite de carbono-13 y a la señal principal.



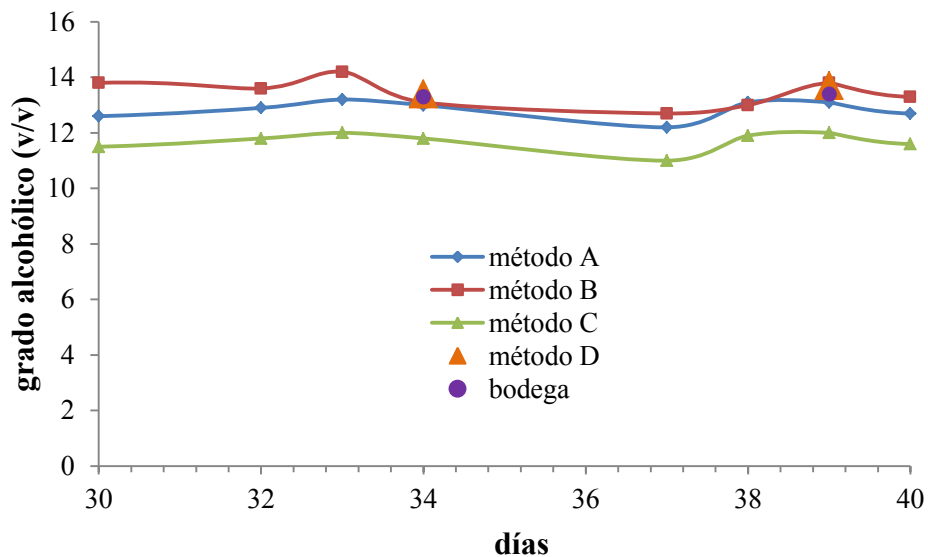
**Figura 4.12.** Espectro empleado en el método **D** representando las señales de agua y etanol.

En la Figura 4.13 se representan los valores de grado alcohólico obtenidos por cada método expresados en porcentaje v/v. Se puede observar como existe una buena correlación entre los métodos **A** y **D** con los datos aportados por la bodega utilizando el método de infrarrojo con el equipo Foss WineScan<sup>TM</sup> FT 120. En la Figura 4.14 se muestra una ampliación de la Figura 4.13.

Cabe destacar que aunque el método **D** sólo puede ser utilizado para cuantificar etanol, al ser un experimento rápido y sin alteración de la muestra, puede competir con los métodos de análisis empleados de forma rutinaria.



**Figura 4.13.** Evolución del etanol medido por diferentes métodos; método A, patrón externo usando el área del pico principal; método B, patrón externo usando el área del satélite derecho; método C, mediante recta de calibrado usando el área del pico principal; método D, RMN de protón registrado con un programa de pulso habitual y por último la medida obtenida por la bodega usando el método de infrarrojo.



**Figura 4.14.** Ampliación de la zona señalada en la Figura 4.13.

En la Tabla 4.4 se muestran los datos representados en la Figura 4.13.

**Tabla 4.4.** Tabla resumen de los datos representados en la gráfica expresados en grado alcohólico (v/v).

<b>día</b>	<b>método A</b>	<b>método B</b>	<b>método C</b>	<b>método D</b>	<b>bodega</b>
<b>1</b>	0.0548	0	-0.104	--	--
<b>2</b>	0.577	0.955	0.378	--	--
<b>3</b>	6.762	7.09	6.08	--	--
<b>4</b>	9.90	9.77	9.00	--	--
<b>5</b>	11.15	12.0	10.1	--	--
<b>6</b>	12.0	12.2	10.9	--	--
<b>7</b>	12.8	13.9	11.7	--	--
<b>8</b>	12.7	14.7	11.6	--	--
<b>9</b>	12.7	14.6	11.5	--	--
<b>10</b>	13.0	15.4	11.8	--	--
<b>11</b>	12.9	13.9	11.8	--	--
<b>12</b>	13.3	15.0	12.1	13.9	13.3
<b>18</b>	13.2	13.5	12.0	--	--
<b>24</b>	12.2	12.9	11.1	--	--
<b>30</b>	12.6	13.8	11.5	--	--
<b>32</b>	12.9	13.6	11.8	--	--
<b>33</b>	13.2	14.2	12.0	--	--
<b>34</b>	13.0	13.1	11.8	13.4	13.3
<b>37</b>	12.2	12.7	11.0	--	--
<b>38</b>	13.1	13.0	11.9	--	--
<b>39</b>	13.1	13.8	12	13.7	13.4
<b>40</b>	12.7	13.3	11.6	--	--
<b>54</b>	12.5	13.4	11.4	--	--
<b>80</b>	13.5	14.7	12.3	13.6	13.5
<b>111</b>	13.1	14.4	11.9	13.4	13.3
<b>143</b>	13.2	14.3	12.0	--	--
<b>167</b>	12.6	14.1	11.4	13.1	13.6
<b>207</b>	12.5	13.6	11.4	13.0	13.5

- **Cuantificación del ácido acético**

Del mismo modo, se decidió estudiar la formación del ácido acético durante todo el proceso de elaboración del vino,<sup>16</sup> debido a la gran importancia de éste en las características organolépticas de un vino de calidad. El ácido acético es el principal componente de la acidez volátil, aportando a ésta hasta un 97% aproximadamente, y se genera principalmente durante el proceso de fermentación de las levaduras como resultado de la oxidación del acetaldehído. El ácido acético también es formado como consecuencia del metabolismo aerobio de las bacterias acéticas del género *Acetobacter spoilage*. Éstas, en condiciones aerobias, metabolizan el azúcar generando ácido acético.

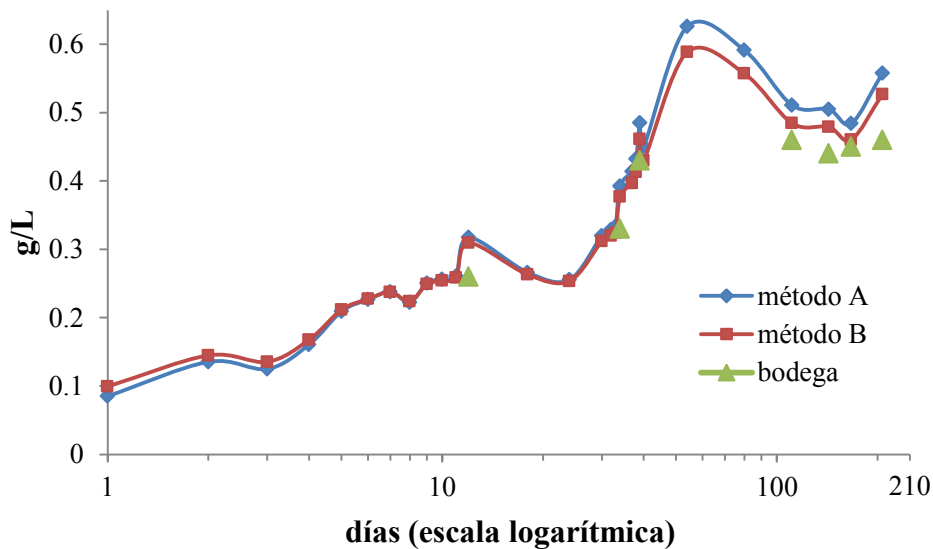
La evolución de esta formación se siguió mediante la medida de la cantidad de ácido acético expresado en gramos por litro. Esta cuantificación se realizó usando dos métodos, el método **A**, empleando el estándar externo con la constante calculada previamente, y el método **B**, mediante la interpolación en la recta de calibrado.

Las cantidades obtenidas se compararon con las aportadas por la bodega mediante el método de infrarrojo. Se observó en todos los casos una correlación adecuada, como puede verse en la Figura 4.15 y en la Tabla 4.5.



**Tabla 4.5.** Tabla resumen de los datos representados en la gráfica expresados en g/L.

día	método A	método B	bodega	día	método A	método B	bodega
1	0.0851	0.0994	--	30	0.320	0.312	--
2	0.135	0.145	--	32	0.329	0.320	--
3	0.125	0.135	--	33	0.334	0.324	--
4	0.161	0.168	--	34	0.392	0.377	0.33
5	0.209	0.212	--	37	0.414	0.397	--
6	0.227	0.227	--	38	0.432	0.413	--
7	0.238	0.237	--	39	0.485	0.461	0.43
8	0.223	0.224	--	40	0.450	0.430	--
9	0.250	0.249	--	54	0.626	0.589	--
10	0.256	0.254	--	80	0.591	0.55723	--
11	0.261	0.258	--	111	0.511	0.485	0.46
12	0.317	0.309	0.26	143	0.505	0.479	0.44
18	0.266	0.263	--	167	0.484	0.460	0.45
24	0.255	0.254	--	207	0.558	0.527	0.46

**Figura 4.15.** Evolución del ácido acético medido por el método A (estándar externo), método B (recta de calibrado) y la medida de la bodega mediante el método de infrarrojo en g/L.

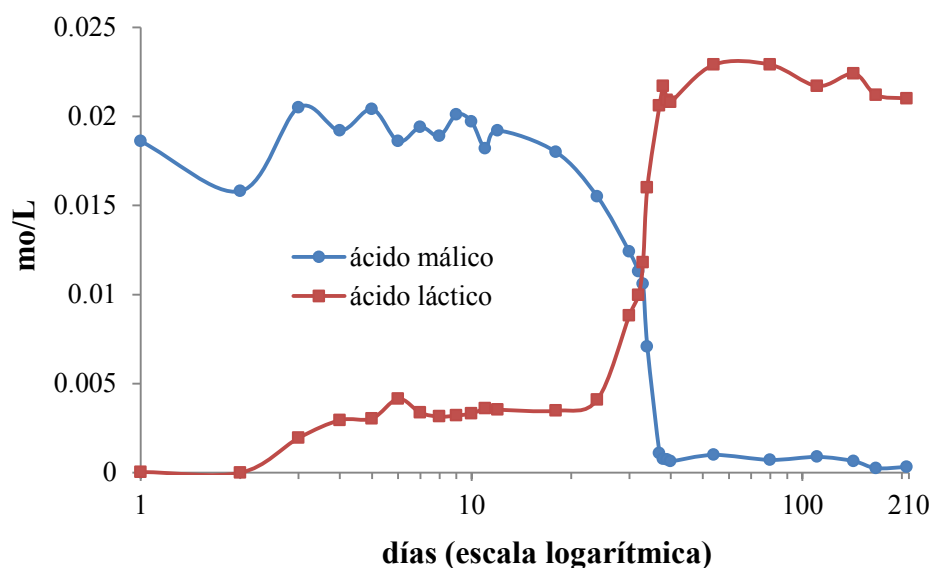
A la vista de los resultados obtenidos en los apartados anteriores, a la hora de cuantificar el resto de los compuestos mediante el procesado de los espectros previamente adquiridos, se decidió emplear como único método el del patrón externo.

- **Cuantificación de los ácidos málico y láctico**

El seguimiento de los ácidos málico y láctico se realizó también sobre este vino mediante el método del patrón externo. En la Figura 4.16 se representa la evolución de la fermentación maloláctica, expresada en términos de mol/L de ácido málico consumido y ácido láctico formado. Después de 40 días, la fermentación maloláctica ha llegado a su fin comprobado por la inversión de las concentraciones de los ácidos málico y láctico. En la Tabla 4.6 se muestran los datos representados en la Figura 4.16, en términos de mol/L.

**Tabla 4.6.** Tabla resumen de los datos representados en la gráfica expresados en mol/L.

día	ácido málico	ácido láctico	día	ácido málico	ácido láctico
1	0.0186	0.0000409	30	0.0124	0.00882
2	0.0158	0.0000	32	0.0113	0.00997
3	0.0205	0.00195	33	0.0106	0.0118
4	0.0192	0.00295	34	0.00707	0.0160
5	0.0204	0.00304	37	0.00110	0.0206
6	0.0186	0.00415	38	0.000775	0.0217
7	0.0194	0.00337	39	0.000740	0.0209
8	0.0189	0.00315	40	0.000638	0.0208
9	0.0201	0.00321	54	0.00100	0.0229
10	0.0197	0.00332	80	0.000722	0.0229
11	0.0182	0.00360	111	0.000889	0.0217
12	0.0192	0.00354	143	0.000650	0.0224
18	0.0180	0.00348	167	0.000257	0.0212
24	0.0155	0.00410	207	0.000325	0.0210



**Figura 4.16.** Evolución de la fermentación maloláctica expresado en mol/L de ácido málico consumido y ácido láctico formado.

- **Cuantificación de la alanina**

En el vino también están presentes otros muchos compuestos importantes en el proceso de elaboración. De entre éstos, cabe destacar la presencia del aminoácido alanina, presente en mayor cantidad en los mostos. Sirve de fuente de nitrógeno para las levaduras (nitrógeno fácilmente asimilable o FAN) y para la formación del ácido pirúvico, del acetaldehído y del etanol durante el proceso de Ehrlich.<sup>18,19</sup> El ácido pirúvico es importante debido a la facilidad de enlazar con el SO<sub>2</sub> y reaccionar con los compuestos fenólicos. La concentración de alanina en el depósito disminuye 0.836 mmol/L en 40 días (Figura 4.17). Este hecho está de acuerdo con la importancia del consumo del nitrógeno fácilmente asimilable (FAN) para el desarrollo de las levaduras.

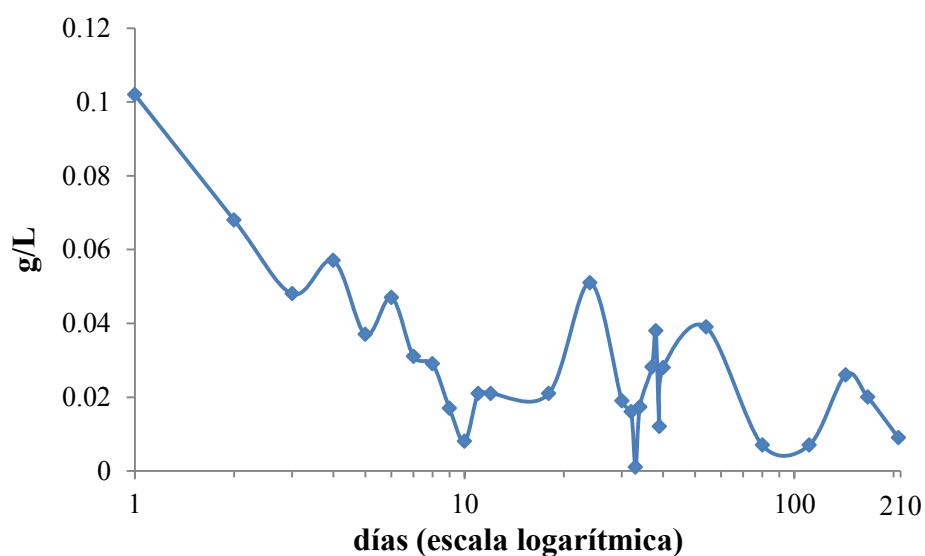
<sup>18</sup> Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology Volume 1; The chemistry of wine stabilization and treatments 2<sup>nd</sup> Edition*, John Wiley and Sons, Ltd, 2006.

<sup>19</sup> Bell, S. J.; Henschke, P. A. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242–295.

En la Tabla 4.7 se muestran los datos representados en la Figura 4.17, en términos de g/L.

**Tabla 4.7.** Tabla resumen de los datos representados en la gráfica expresados en g/L.

día	alanina	día	alanina
1	0.102	30	0.019
2	0.068	32	0.016
3	0.048	33	0.000
4	0.057	34	0.0173
5	0.037	37	0.0282
6	0.047	38	0.038
7	0.031	39	0.012
8	0.029	40	0.028
9	0.017	54	0.039
10	0.008	80	0.007
11	0.021	111	0.007
12	0.021	143	0.026
18	0.021	167	0.02
24	0.051	207	0.009



**Figura 4.17.** Evolución de la concentración de alanina medida por patrón externo y expresada en g/L.

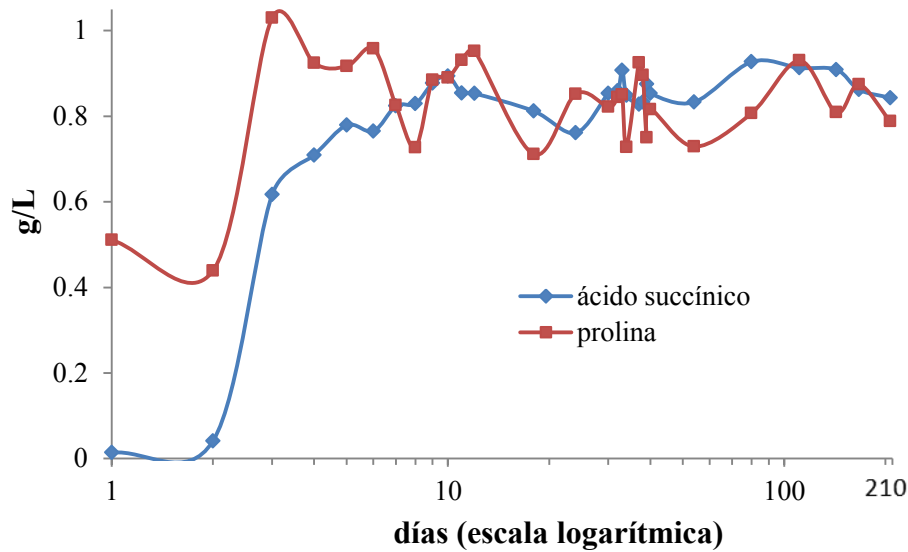
- **Cuantificación del ácido succínico**

El ácido succínico (ó 1,4-butanodioico) se desarrolla durante la fermentación alcohólica debido a la acción de las levaduras, siendo por ello un marcador de la fermentación alcohólica. Los valores que alcanza habitualmente en un vino son próximos a 1 g/L.

Este ácido es producido por todos los organismos vivos ya que está implicado en el metabolismo lipídico y en el ciclo de Krebs,<sup>14</sup> junto con el ácido fumárico. Después de la fermentación alcohólica, la concentración del ácido succínico en el vino estudiado es de 0.894 g/L; cuando la fermentación maloláctica finaliza, éste toma un valor de 0.853 g/L y se mantiene más o menos constante hasta el final del proceso de vinificación (Figura 4.18, Tabla 4.8).

**Tabla 4.8.** Tabla resumen de los datos representados en la gráfica expresados en g/L.

día	ácido succínico	prolina	día	ácido succínico	prolina
1	0.0138	0.511	30	0.853	0.822
2	0.0412	0.439	32	0.859	0.844
3	0.617	1.03	33	0.907	0.850
4	0.709	0.924	34	0.849	0.728
5	0.779	0.917	37	0.828	0.925
6	0.765	0.958	38	0.833	0.896
7	0.824	0.826	39	0.875	0.750
8	0.829	0.727	40	0.853	0.816
9	0.877	0.885	54	0.833	0.729
10	0.894	0.890	80	0.927	0.807
11	0.854	0.931	111	0.913	0.930
12	0.853	0.952	143	0.909	0.809
18	0.812	0.711	167	0.862	0.874
24	0.761	0.852	207	0.843	0.788



**Figura 4.18.** Evolución del ácido succínico y la prolina medidos por patrón externo y expresados en g/L.

- **Cuantificación de la prolina y arginina**

De entre todos los aminoácidos presentes en el mosto cabe destacar la presencia de la prolina, cuya abundancia es superior al resto de aminoácidos, representando del 30% al 85% del total. Millery y sus colaboradores<sup>20</sup> establecieron una correlación entre la concentración de prolina y la relación [azúcar/ácidos], es decir, sobre la madurez de la uva (IM). De esta manera, desarrollaron una teoría para diferentes variedades con la correspondiente fórmula:

$$\text{Log [prolina]} = a[\text{IM}] + b$$

donde **a** y **b** son la ordenada en el origen y la pendiente de la recta que relaciona ambas variables para cada variedad estudiada. Así, la prolina parece ser un

<sup>20</sup> Millery, A.; Duteurtre, B.; Boudaille, J. P.; Maujean, A. *Rev. Fr. Oenol.* **1986**, *103*, 32–50.

marcador de la madurez al aumentar su contenido dos semanas antes de la vendimia.<sup>14,17</sup>

Por otro lado, tanto la concentración de la prolina como la de su derivado hidroxilado han sido utilizadas como herramienta discriminatoria para diferenciar vinos elaborados con diferentes variedades y de diferentes zonas.<sup>21</sup> Se basa en el hecho de que la prolina habitualmente no es metabolizada por las levaduras durante la fermentación. También se ha conocido que plantas con altos contenidos de prolina han sufrido en algún momento de su ciclo biológico estrés hídrico.

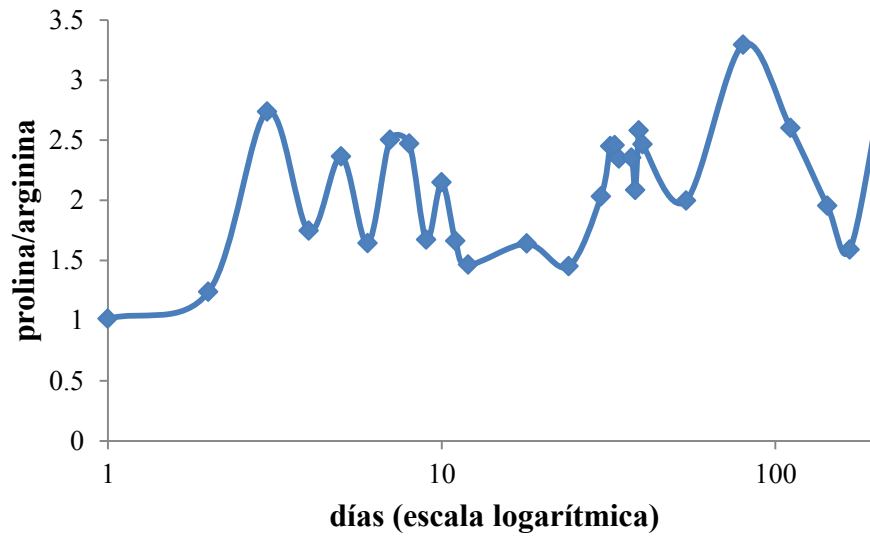
Durante los primeros momentos de la fermentación alcohólica se observa un incremento del contenido en prolina, alcanzando valores de 1.03 g/L; sin embargo la evolución presenta otro mínimo en el 8º día con valores de 0.727 g/L. A partir de este momento hasta el final del proceso la concentración de prolina varía en un rango de 0.850 y 0.930 g/L (Figura 4.18, Tabla 4.8).

La arginina es una importante fuente de nitrógeno para las levaduras debido al metabolismo que sufre formando L-ornitina y urea, los cuales en condiciones adecuadas forman glutamato y amonio. Bajo la misma ruta, también se puede generar prolina, la cual, al no poder ser degradada a glutamato en condiciones anaerobias, aumenta el contenido de ésta en los vinos.

Algunos autores explican la diferente acumulación de prolina y arginina en diferentes variedades de uva basadas en la relación de estos dos aminoácidos mediante un índice.<sup>14</sup> Este índice refleja la proporción de nitrógeno no asimilable (prolina) y asimilable (arginina), siendo indicador del valor nutricional presente en el mosto para el desarrollo de las levaduras. Las concentraciones de prolina y arginina pueden variar de 10 a 15 veces su valor en función de la variedad, tomando, por ejemplo la prolina, valores comprendidos entre 0.3 y 4.6 g/L.

---

<sup>21</sup> Vasconcelos, A. M. P.; Dasneves, H. J. C. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 931–937.



**Figura 4.19.** Evolución de la relación prolina/arginina.

La relación prolina/arginina es relativamente constante de una cosecha a otra de la misma variedad.<sup>18</sup> En este estudio, en la evolución de la relación prolina/arginina, se observa un valor inicial de 1.08. Durante la fermentación alcohólica la relación varía entre valores 3.37 y 1.18. Después de la fermentación maloláctica, con altos niveles de arginina consumida, la relación aumenta a 3.76, disminuyendo posteriormente a 1.75 al final del proceso (Figura 4.19).

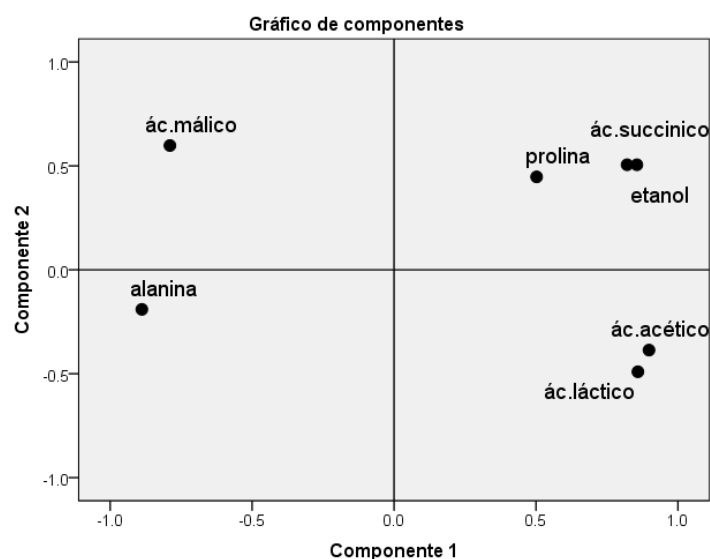
A modo de resumen, en la siguiente tabla se muestran los datos obtenidos para cada compuesto a lo largo de todo el proceso mediante el método del patrón externo, en términos de g/L, y también los valores de la desviación estándar relativa (RSD) calculados para cada compuesto una vez realizado cada análisis por triplicado.



**Tabla 4.9.** Tabla resumen de los datos obtenidos para cada compuesto a lo largo de todo el proceso mediante el método del patrón externo en términos de g/L.

día	método A													
	ethanol		ác. acético		ác. málico		ác. láctico		ác. succínico		prolina		alanina	
	g/L	RSD	g/L	RSD	g/L	RSD	g/L	RSD	g/L	RSD	g/L	RSD	g/L	RSD
1	0.38	18.7	0.074	17.8	2.28	9.7	0.0035	53.5	0.0123	12.6	0.45	14.2	0.0923	11.7
2	5.87	20.7	0.174	19.8	2.49	10.3	0.0293	24.5	0.0497	15.8	0.54	16.1	0.0915	19.2
3	53.1	0.44	0.132	5.07	2.7	1.65	0.18	5.25	0.606	1.88	1.05	5.4	0.0649	8
4	80.3	2.32	0.202	8.33	2.65	6.84	0.283	9.31	0.733	5.7	0.99	8.14	0.0689	11.7
5	89.3	2.42	0.209	1.89	2.72	7.19	0.298	12.6	0.773	6.4	0.86	8.84	0.048	16.8
6	98.2	3.43	0.225	0.92	2.56	2.59	0.343	5.88	0.785	2.4	0.78	11	0.0485	11.5
7	101	0.58	0.22	11	2.55	4.21	0.322	10.7	0.799	3.27	0.76	12.4	0.0344	24
8	101	1.02	0.232	3.86	2.53	2.43	0.355	20.8	0.809	2.85	0.68	15.4	0.0282	11.4
9	101	2.42	0.233	12.3	2.57	7.08	0.332	14.7	0.852	5.07	0.8	9.06	0.0327	40.3
10	104	3.3	0.256	1.62	2.52	6.45	0.342	14.1	0.865	5.65	0.81	9.25	0.0193	33
11	103	1.88	0.258	4.33	2.44	4.29	0.359	10.3	0.847	1.2	0.71	14.6	0.024	18.5
12	104	1.12	0.291	10.8	2.43	4.89	0.361	12.7	0.832	2.96	0.76	9.36	0.0432	23.8
18	105	2.33	0.296	8.99	2.36	6.74	0.324	9.2	0.829	5.29	0.81	11.8	0.0404	32.8
24	98.4	2.72	0.273	8.99	2.16	5.18	0.368	4.2	0.781	2.52	0.77	12.8	0.0444	13
30	95.6	7.6	0.31	4.31	1.54	6.79	0.822	9.77	0.814	4.24	0.69	7.72	0.0245	90.1
32	101	1.16	0.318	3.91	1.48	4.03	0.906	4.19	0.828	3.56	0.7	7.29	0.0196	33.2
33	104	0.97	0.34	1.71	1.29	7.66	1.09	8.57	0.86	5.74	0.79	7.28	0.0223	77.2
34	102	1.03	0.38	5.66	0.869	8.84	1.36	6.19	0.824	3.19	0.71	2.57	0.0226	23.1
37	98.1	4.46	0.408	3.41	0.154	7.09	1.82	1.55	0.821	0.659	0.85	8.11	0.0279	9.05
38	103	0.81	0.435	0.7	0.074	4.96	1.84	3.17	0.849	1.73	0.89	1.12	0.0298	32.3
39	102	1.27	0.456	5.55	0.124	5.55	1.87	6.17	0.867	2.72	0.8	5.68	0.0198	21.4
40	102	1.42	0.458	1.6	0.075	12.6	1.9	3.37	0.862	1.32	0.83	3.66	0.0312	9.35
54	98.1	1.31	0.585	6.29	0.118	7.56	1.92	5.99	0.825	0.884	0.75	3.13	0.0294	37.3
80	104	2.16	0.564	5.22	0.063	7.17	1.94	3.89	0.907	3.35	0.87	10.6	0.0094	23
111	102	2.29	0.513	4.02	0.098	17.9	1.91	0.41	0.884	2.84	0.87	10.7	0.0138	53.3
143	101	3.11	0.493	4.2	0.103	14.3	1.98	2.2	0.861	7.44	0.76	25.5	0.0289	13.5
167	100	0.91	0.493	1.59	0.05	44.6	1.95	4.93	0.876	1.56	0.88	2.59	0.032	32.4
207	98.1	1.71	0.563	1.99	0.068	42.1	1.86	0.39	0.858	1.77	0.85	6.48	0.015	41.1

Con el fin de visualizar mejor la evolución de los compuestos estudiados a lo largo del proceso de elaboración de un vino, se llevó a cabo análisis multivariantes sobre los datos obtenidos con RMN. Mediante el empleo del análisis de componentes principales (PCA), metodología quimiométrica explicada en la parte experimental, se puede explicar el 90% de la varianza de las muestras con las dos primeras componentes principales. La concentración de etanol, prolina, alanina y los ácidos acético, láctico y succínico, son significativos para las dos componentes principales. Los *loading plots* de estos dos factores extraídos del análisis de correlación de la matriz se muestran en la Figura 4.20.



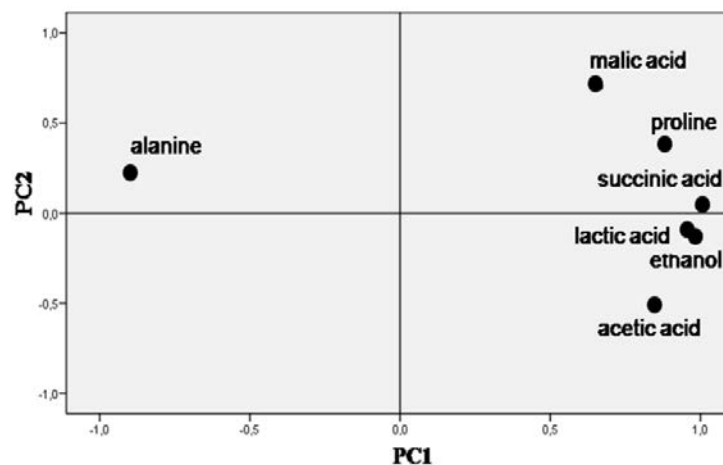
**Figura 4.20.** PCA derivado de los resultados obtenidos mediante RMN de protón a lo largo del proceso de vinificación (fermentaciones alcohólica y maloláctica).

La primera componente (CP1) muestra la correlación positiva de los ácidos succínico, láctico y acético además del etanol y la correlación negativa para el ácido málico y la alanina. En cambio, las concentraciones de prolina y ácido málico tienen relevancia para las dos componentes (CP1 y CP2).

Estos resultados describen una clara tendencia: el incremento de concentración del etanol, los ácidos succínico, láctico y acético, y el descenso de la concentración de alanina y ácido málico a lo largo del proceso de vinificación. Por el contrario, la segunda componente (CP2) indica la pauta de consumo del ácido málico y la alanina.

Con el fin de estudiar la evolución de los analitos a lo largo de cada proceso de fermentación, se realizaron dos análisis de componentes principales, tomando para el primero los datos obtenidos durante los 7 primeros días, correspondientes a la fermentación alcohólica (Figura 4.21) y para el segundo los días restantes (8-207 días), correspondientes a la fermentación maloláctica (Figura 4.22).

Así, con el análisis de componentes principales derivado de los datos obtenidos de la fermentación alcohólica se explicaba el 94% de la varianza de las muestras y su representación se muestra en la Figura 4.21.



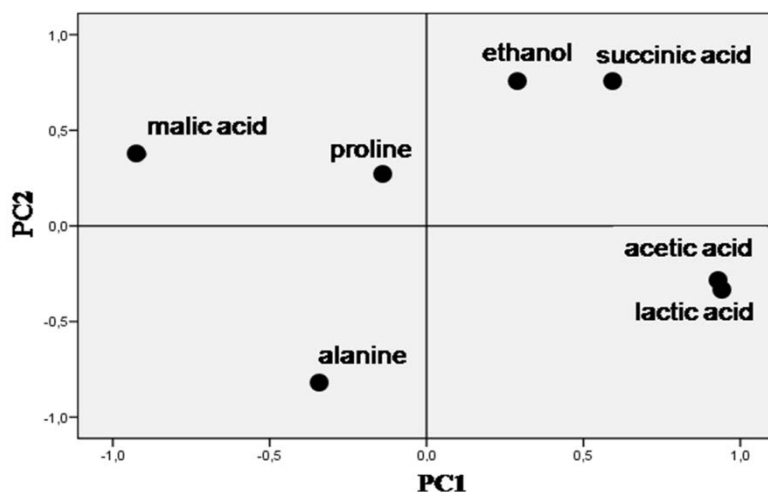
**Figura 4.21.** Análisis de componentes principales derivado de los resultados obtenidos mediante RMN de protón a lo largo de la fermentación alcohólica.

En este caso, la primera componente (CP1) muestra una correlación positiva con todos los analitos a excepción de la alanina, que tiene una correlación muy negativa. En cambio, para la segunda componente (CP2) sólo son significativos los

ácidos málico y acético. Las conclusiones más importantes extraídas de este análisis son el incremento a lo largo de la fermentación alcohólica del etanol, la prolina y los ácidos succínico y láctico y el descenso en la concentración de la alanina.

Dichos resultados concuerdan con los estudios realizados sobre el seguimiento metabólico de numerosos compuestos del vino realizados con otras técnicas analíticas.

El análisis de componentes principales correspondiente a la fermentación maloláctica mostrado en la Figura 4.22, explica el 76% de la varianza de las muestras con las dos primeras componentes.



**Figura 4.22.** Análisis de componentes principales derivado de los resultados obtenidos mediante RMN de protón a lo largo de la fermentación maloláctica.

Los ácidos acético y láctico muestran una correlación positiva con la componente primera (CP1), mientras que en el ácido málico es negativa. La segunda componente (CP2) refleja el aumento del contenido de etanol y ácido succínico y la disminución de la alanina a lo largo de esta fermentación. Al

contrario que el resto de los compuestos, la concentración de la prolina no es significativa para ninguna de las dos componentes principales.

Comparando los tres análisis de componentes principales, las conclusiones que se pueden obtener son las siguientes. A lo largo de la fermentación alcohólica existe un incremento muy importante del contenido del etanol, la prolina, y el ácido succínico y un consumo muy importante de alanina. Mientras el ácido málico apenas sufre disminución, se observa un aumento en el contenido del ácido láctico. A lo largo de la fermentación maloláctica se observa como el contenido de los ácidos acético y láctico aumenta mientras que el del málico disminuye.



#### 4.4. Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de polifenoles durante la elaboración de un vino crianza de la D.O.Ca. Rioja.

##### 4.4.1. Cuantificación de polifenoles mediante patrón externo

Una vez estudiada la evolución de las fermentaciones alcohólica y maloláctica con la cuantificación de compuestos como el etanol, los ácidos málico, láctico, acético y succínico o aminoácidos como la alanina, la prolina y la arginina, este trabajo se centra en los compuestos fenólicos. Estos polifenoles tienen gran importancia en uvas y vinos porque intervienen en propiedades sensoriales como el color, la astringencia, amargor y aspereza. También intervienen en reacciones de oxidación y en procesos de envejecimiento y crianza de los vinos.<sup>22</sup>

Desde el punto de vista cuantitativo, los compuestos fenólicos más relevantes en el vino son los taninos, los antocianos, los ácidos fenólicos, los flavonoles y dihidroflavonoles y los estilbenos. El contenido de polifenoles totales en la uva depende de numerosos factores ambientales y agronómicos, como el tipo de variedad de vid o la metodología de cultivo. Su concentración en vino depende, además de la cantidad de polifenoles en uva, de las prácticas de vinificación, como los remontados o las maceraciones prefermentativas que favorecen su extracción de los hollejos. También, los vinos envejecidos en barrica reciben un aporte importante de polifenoles del roble de la barrica. Todo esto hace que el mosto y el vino sean un alimento rico en polifenoles.

---

<sup>22</sup> Moreno, J. J.; Peinado, R. A. *Química enológica*, 1ª Ed. Mundi-prensa 2010.

El contenido de ácido gálico en el vino tinto varía entre 10 y 30 mg/L,<sup>23</sup> mientras que el de la catequina lo hace entre 49.9 y 126.2 mg/L<sup>24</sup> y el resveratrol entre 0.06 y 30 mg/L.<sup>25</sup>

Los taninos, como la catequina, son responsables de la astringencia del vino tinto y de gran influencia en el color. Los antocianos, como la malvidina, son los responsables del color rojo de la uva y del vino tinto. Los ácidos fenólicos, como el ácido gálico, toman color amarillo al oxidarse y son precursores de fenoles volátiles. Y los estilbenos, como el resveratrol, no influyen en las propiedades sensoriales del vino, pero se está estudiando en profundidad por los posibles beneficios para la salud humana.

La evolución de las técnicas de vinificación y la exigencia de los consumidores han hecho que los vinos más valorados y demandados sean aquellos que poseen un alto grado de color y una astringencia y amargor considerable. Las propiedades antioxidantes de muchos de estos compuestos y la creencia de su influencia en la salud humana<sup>26</sup> también han hecho que se busquen vinos con altos niveles de polifenoles. Todo esto ha llevado a que durante estas dos últimas décadas, los polifenoles del vino hayan sido foco de estudio en el mundo de la investigación enológica.

En la actualidad, el momento más idóneo para la vendimia, no solo se decide en función del contenido en azúcares que hay en la uva (maduración tecnológica) sino que también se busca el mayor contenido en polifenoles totales (maduración fenólica). Un equilibrio entre estos dos factores hace de una uva la más adecuada para la elaboración de un vino de calidad.

---

<sup>23</sup> Rastija, V.; Srećnik, G.; Medić-Šarić, M. *Food Chem.* **2009**, *115*, 54–60.

<sup>24</sup> Saénz-Navajas, M.-P.; Tao, Y.-S.; Dizy, M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12407–12416.

<sup>25</sup> Feijoó, O.; Moreno, A.; Falqué, E. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 608–613.

<sup>26</sup> Xia, E.-Q.; Deng, G.-F.; Guo, Y.-J.; Li, H.-B. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 622–646.

Existen bastantes estudios de polifenoles en vino empleando HPLC, pero esta metodología requiere de un tratamiento previo para la extracción de los polifenoles de la matriz del vino. Esto hace que, aunque la RMN no compita con ellos en cuanto a la sensibilidad, si lo haga en cuanto a la sencillez y la rapidez de la metodología. Mediante HPLC se ha estudiado la influencia de la variedad de la uva,<sup>27,28</sup> las regiones de producción<sup>23,27,29</sup> o la levadura<sup>27</sup> empleada en el contenido de polifenoles en el vino.

El tándem de RMN con otras técnicas (HPLC y espectrometría de masas) ha servido para identificar y cuantificar numerosos polifenoles presentes en alimentos líquidos como la cerveza, el vino o zumos de frutas.<sup>30</sup>

Empleando la RMN se han identificado numerosos compuestos fenólicos en vino<sup>31</sup> y en uva<sup>32</sup> empleando espectros tanto mono como bi-dimensionales. También se ha estudiado la evolución de la maduración de tres tipos de uva mediante la cuantificación relativa de numerosos compuestos como aminoácidos, ácidos y polifenoles.<sup>32</sup>

Con estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos como finalidad hacer un estudio en profundidad de los polifenoles representativos en vino mediante la cuantificación de la catequina, el ácido gálico y el resveratrol durante la elaboración de un vino crianza. Para ello, se partió de tres depósitos de uva tinta de variedad tempranillo, pertenecientes a Bodegas Altanza (Figura 4.23), situada en Fuenmayor y que forma parte de la D.O.Ca. Rioja.

---

<sup>27</sup> Pour Nikfardjam, M. S.; Pickering, G. J. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1077–1083.

<sup>28</sup> Hogan, S.; Zhang, L.; Li, J.; Zoecklein, B.; Zhou, K. *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 1269–1274.

<sup>29</sup> Ertan Anli, R.; Vural, N. *Molecules* **2009**, *14*, 289-297.

<sup>30</sup> Gil, A. M.; Duarte, I. F.; Godejohann, M.; Braumann, U.; Maraschin, M.; Spraul, M. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *488*, 35–51.

<sup>31</sup> Ali, K.; Maltese, F.; Toepfer, R.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. *J. Biomol. NMR* **2011**, *49*, 255–266.

<sup>32</sup> Ali, K.; Maltese, F.; Fortes, A. M.; Pais, M. S.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. *Food. Chem.* **2011**, *124*, 1760–1769.



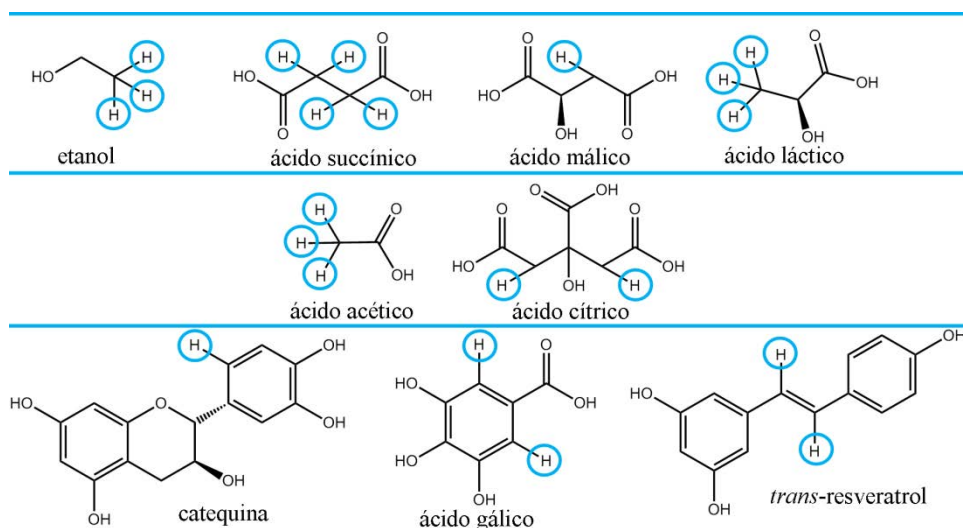


**Figura 4.23.** Bodegas Altanza, Fuenmayor.

Como se ha comentado previamente, para aplicar la RMN cuantitativa con éxito es esencial la selección apropiada de los parámetros de procesado de los espectros, además de la optimización en la integración de los señales.

Se estudió la fermentación alcohólica cuantificando el etanol y el ácido succínico como controles de la cinética de la fermentación. Después se siguió la evolución de la fermentación maloláctica cuantificando los ácidos málico y láctico. También se controlaron los niveles de los ácidos acético y cítrico a lo largo de todo el proceso. Por último, se estudiaron los polifenoles catequina, ácido gálico y resveratrol a lo largo de todo el proceso (Figura 4.24).

Las señales que fueron empleadas en la cuantificación para el etanol y los ácidos succínico, málico, láctico y acético son los mismos que los utilizados en el apartado anterior. Para el ácido cítrico se integraron dos hidrógenos equivalentes metilénicos (doblete,  $^3J=15.7$  Hz, 2H) a 2.97 ppm; para la catequina se integró un hidrógeno aromático (doblete,  $^3J=8.2$  Hz, 1H) a 6.83 ppm; para el ácido gálico dos hidrógenos aromáticos equivalentes (singlete, 2H) a 7.15 ppm y para el resveratrol dos hidrógenos alquenílicos equivalentes (doblete,  $^3J=2.2$  Hz, 2H) a 6.62 ppm.



**Figura 4.24.** Estructuras de los compuestos a analizar, identificando en cada uno de ellos los protones integrados en un espectro de RMN de protón (600 MHz).

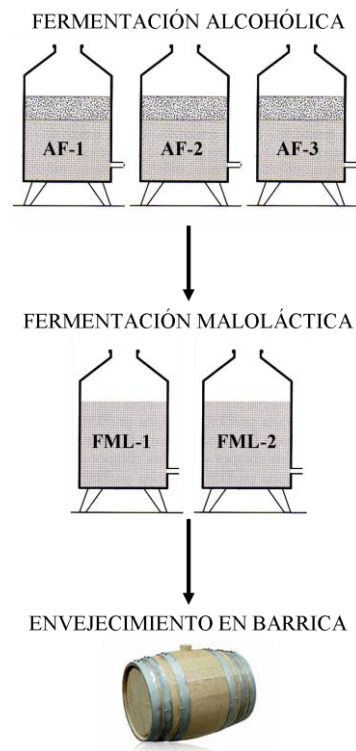
Se realizó el cálculo de las constantes mediante tres experimentos con el fin de evaluar la reproducibilidad de las mismas. Los valores de las constantes y las desviaciones estándar obtenidas para cada compuesto son los siguientes:

**Tabla 4.10.** Tabla resumen de las constantes que relacionan cada compuesto con el ácido succínico.

	etanol	ácido acético	ácido málico	ácido láctico	ácido succínico	ácido cítrico	catequina	ácido gálico	trans-resveratrol
$k_1$	0.902	0.875	1.01	1.18	0.972	0.965	1.06	0.773	1.10
$\sigma$	0.027	0.067	0.05	0.05	0.056	0.137	0.08	0.059	0.04

#### 4.4.2. Seguimiento de polifenoles y de otros compuestos durante la elaboración de un vino crianza

Tres depósitos de Bodegas Altanza se llenaron con uva tinta de variedad Tempranillo despalillada y estrujada. El mosto se acondicionó de manera habitual adicionando sulfuroso gas, como antiséptico y antimicrobiano y levaduras para iniciar la fermentación alcohólica. Cuando las fermentaciones alcohólicas finalizaron, se descubó y se mezclaron para realizar la fermentación maloláctica en dos depósitos. Una vez finalizada la fermentación maloláctica, los vinos fueron traspasados a barrica a realizar la crianza.



**Figura 4.25.** Esquema del proceso de elaboración del vino.

Las composiciones del mosto y del vino antes de la fermentación maloláctica y antes de trasvasar a barrica fueron medidas mediante técnicas de infrarrojo (Foss WineScan<sup>TM</sup> FT 120, Figura 4.11), y están indicadas en la tabla siguiente:

**Tabla 4.11.** Tabla resumen de la composición de los mostos y vinos estudiados.

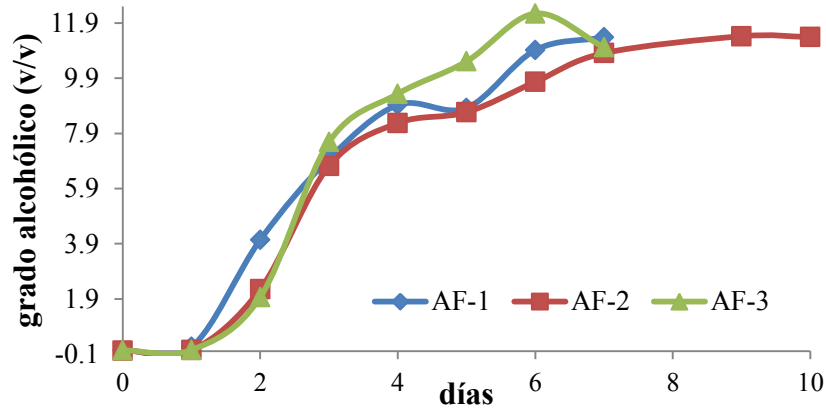
	MOSTO			VINO (FML)		VINO
	AF-1	AF-2	AF-3	FML-1	FML-2	(barrica)
grado alcohólico (v/v)	-	-	-	13.4	12.1	12.8
acidez total (g/L ac. Tartárico)	6.67	6.60	7.22	7.33	6.67	5.98
azúcares (g/L)	244	247	258	2.58	2.47	2.28
ácido málico (g/L)	1.66	1.32	1.67	1.89	1.59	-
pH	3.43	3.34	3.39	3.56	3.37	3.82

Se recogieron un total de 69 muestras de mosto y vino a lo largo del proceso de vinificación. Durante la fermentación alcohólica se tomaron 8 (AF-1), 10 (AF-2) y 8 (AF-3) muestras de cada depósito. Durante la fermentación maloláctica 15 (FML-1) y 16 (FML-2) muestras, y 12 muestras durante el tiempo en barrica. Dichas muestras fueron tomadas directamente de los depósitos o de las barricas y fueron guardadas a -25 °C hasta el momento de ser analizadas. Para realizar el análisis se descongelaron, se ajustó el pH a 3 y se introdujeron 0.54 mL en un tubo de RMN de 5 mm junto con 0.06 mL de D<sub>2</sub>O con TSP. Posteriormente, mediante el programa de pulsos expuesto en el capítulo 3 (material y métodos) se obtuvieron los espectros de RMN de protón con el equipo de 600 MHz para protón.

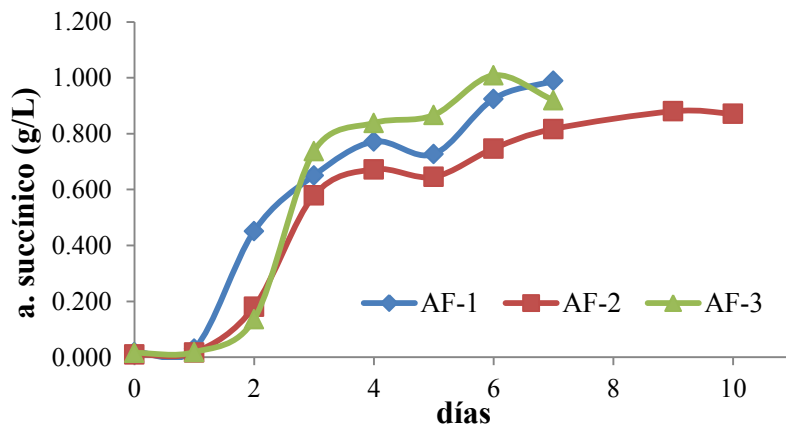
- **Cuantificación del etanol y del ácido succínico**

Con el fin de observar la correcta evolución de la fermentación alcohólica de cada depósito, se cuantificó la cantidad de etanol y de ácido succínico generado por las levaduras. La cantidad de etanol generado depende, fundamentalmente, de la cantidad de azúcares presentes en el mosto y del rendimiento de trabajo de las

levaduras. Ambos compuestos fueron cuantificados empleando la metodología del patrón externo, puesta a punto en este capítulo. El etanol se expresa en grado alcohólico v/v (Figura 4.26), y el ácido succínico en g/L (Figura 4.27).



**Figura 4.26.** Evolución del grado alcohólico (v/v), a lo largo de la fermentación alcohólica de los tres depósitos estudiados.

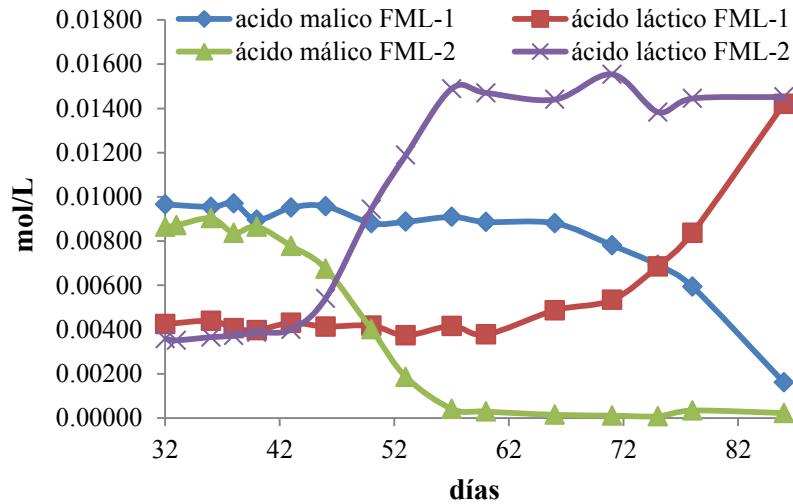


**Figura 4.27.** Evolución del ácido succínico expresado en g/L, a lo largo de la fermentación alcohólica de los tres depósitos estudiados.

En las condiciones adecuadas de fermentación, la cinética de producción de ambos compuestos describe una función exponencial. Esto es lo que se observa en las gráficas de las Figura 4.26 y Figura 4.27.

- **Cuantificación de los ácidos málico y láctico**

Del mismo modo, se estudió la evolución de la fermentación maloláctica con la conversión del ácido málico a ácido láctico por la acción de las bacterias lácticas. Ambos compuestos fueron cuantificados por el método del patrón externo y se expresan en términos de mol/L (Figura 4.28).



**Figura 4.28.** Evolución de los ácidos málico y láctico expresados en mol/L, a lo largo de la fermentación maloláctica de los dos depósitos estudiados.

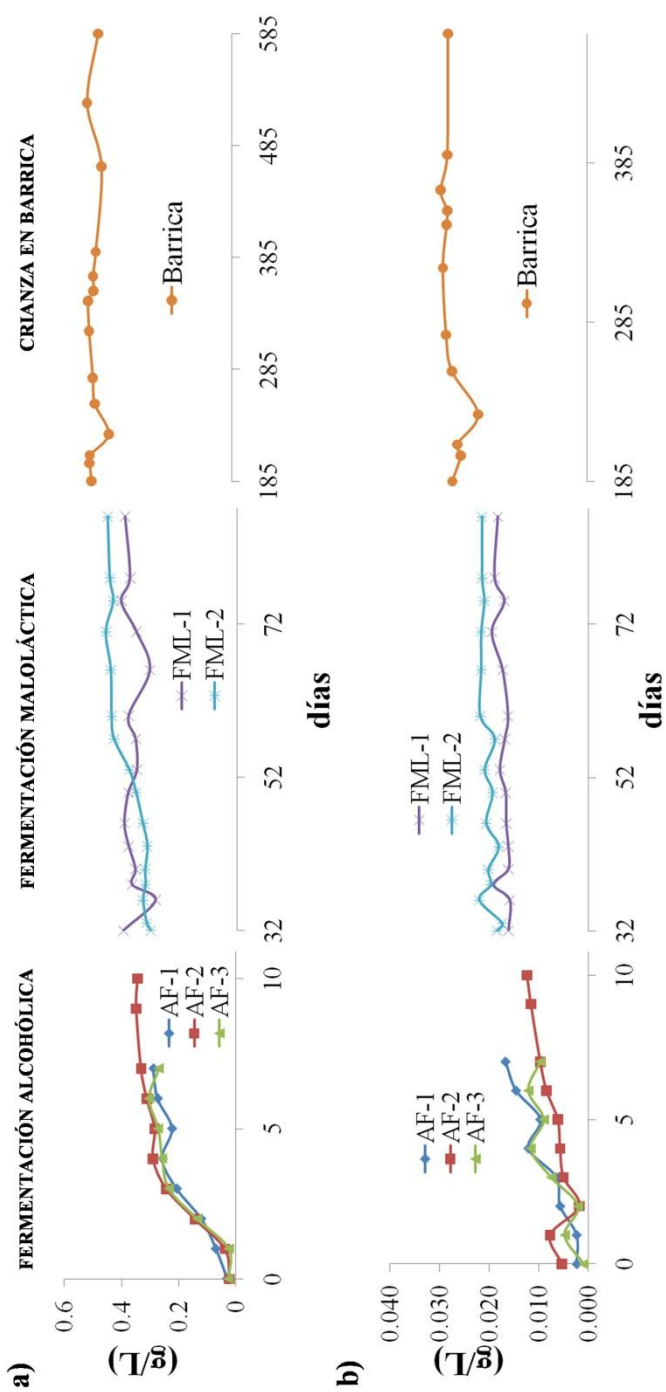
En este caso, los dos depósitos describen una cinética de conversión distinta. El depósito 2 (FML-2) necesitó menos de 30 días para completar la transformación del ácido málico en láctico. En cambio, el depósito 1 (FML-1) comenzó la fermentación prácticamente cuando finalizó el depósito 2, necesitando unos 20 días más para su terminación.

Pero lo fundamental para el vino es que se haya consumido la mayor parte del ácido málico, como así ha sido, con el fin de no ser susceptible a procesos microbiológicos no controlados que lleven a estropearlo.

- **Cuantificación de los ácidos acético y cítrico**

Es ampliamente conocida la influencia negativa del ácido acético en el vino y su generación a partir de las bacterias acéticas en medios aerobios. Pero el ácido acético también proviene de la degradación, por parte de las bacterias lácticas, de ácidos como el cítrico a lo largo de la fermentación maloláctica, como se explica en el capítulo de introducción (Figura 1.20).

Así, se cuantificaron los ácidos acético y cítrico a lo largo de todo el proceso de vinificación (Figura 4.29). Se observó como a lo largo de la fermentación maloláctica aumentaba ligeramente el contenido de ácido acético, pero dentro de los valores normales y sin alcanzar una cantidad peligrosa para el vino. El ácido cítrico no sufrió un descenso en su contenido, sino que aumentó ligeramente; así que probablemente no fue degradado por las bacterias lácticas. El aumento de la concentración del ácido acético pudo surgir como subproducto de otra ruta metabólica.



**Figura 4.29.** Evolución de los ácidos a) acético y b) cítrico expresados en g/L, a lo largo del proceso de vinificación.



- **Cuantificación de polifenoles en vino**

Se cuantificaron tres polifenoles: la catequina (tanino), el ácido gálico (ácido fenólico) y el resveratrol (estilbeno), siguiendo la metodología del patrón externo puesta a punto en este capítulo.

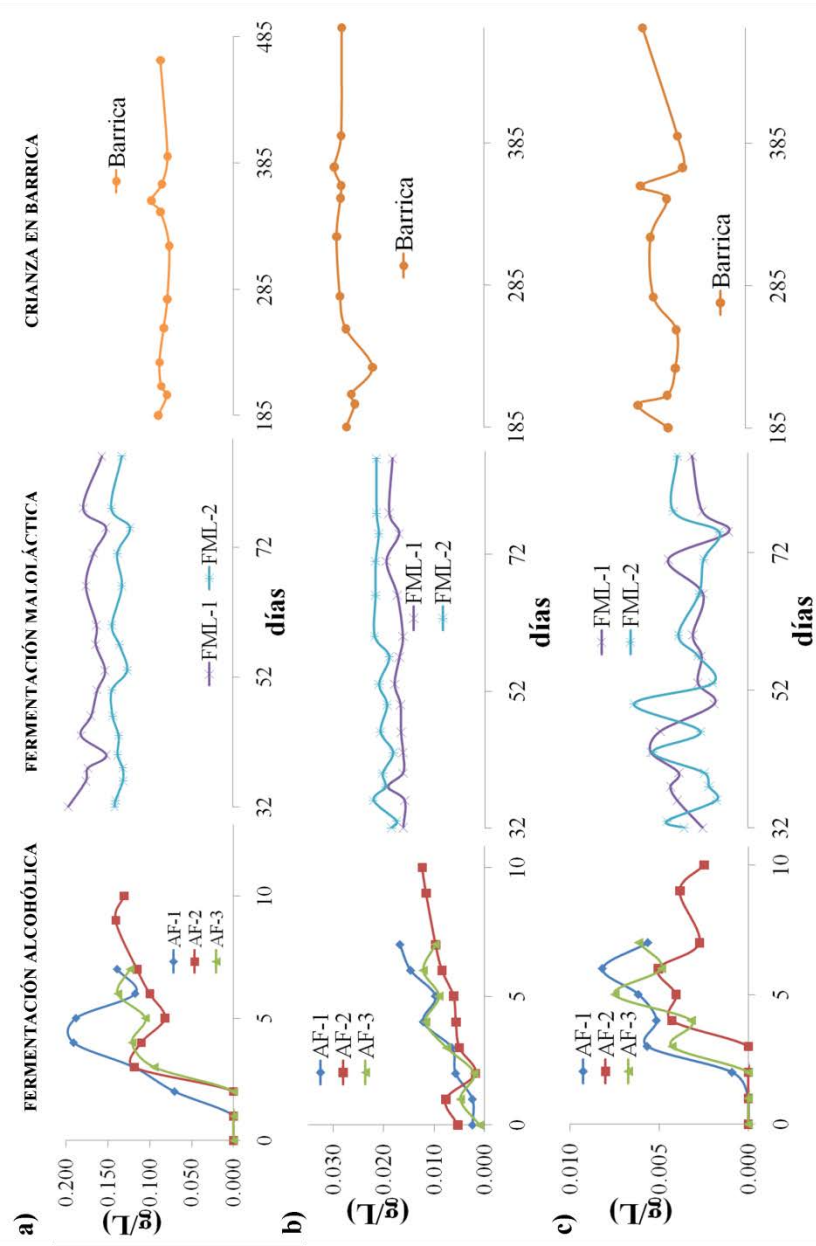
La catequina está principalmente en las pepitas y en el hollejo de las uvas y se transfiere al mosto una vez comenzada la fermentación alcohólica, cuando la extracción de los polifenoles es favorecida por los remontados y la presencia de etanol.

Inicialmente, en el mosto no se observa la presencia de catequina, pero en apenas 3 días, cuando la fermentación alcohólica ha comenzado y su extracción se ve favorecida, es cuando se observa su presencia. Su contenido al final de la fermentación alcohólica es de valores próximos a los 0.150 g/L (Figura 4.30). Durante la fermentación maloláctica se mantiene constante. En su paso a barrica existe un ligero aumento, que luego se mantiene constante debido a que se encuentra en equilibrio con los taninos aportados por la barrica y con los que van reaccionando con los aldehídos, también provenientes de la barrica, como el siringaldehído o la vainillina.<sup>33</sup>

El ácido gálico en la uva está presente en el hollejo y en la pulpa, así que con solo el estrujado de la uva ya está presente en el mosto. Desde el comienzo de la fermentación alcohólica se puede observar su presencia. Pero al igual que con el resto de los polifenoles, con la presencia de etanol y con los remontados el contenido de ácido gálico aumenta hasta valores próximos a 0.017 g/L. Durante la fermentación maloláctica, el contenido se mantiene constante y en contacto con

---

<sup>33</sup> Nonier, M.-F.; Vivas, N.; Vivas de Gaulejac, N.; Pianet, I.; Fouquet, E. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 2081–2091.



**Figura 4.30.** Evolución de a) la catequina y b) el ácido gálico y c) el resveratrol, expresados en g/L, a lo largo del proceso de vinificación.

la madera de la bodega, su contenido no se ve afectado. En cambio si se observa un aumento hasta valores de 0.028 g/L durante el periodo en el que el vino se encuentra estabilizado en un depósito de acero inoxidable esperando a pasar a bodega.

El resveratrol está principalmente en el hollejo y, al igual que la catequina, no se observa en el mosto hasta que comienza la fermentación. Su extracción se ve favorecida por el etanol y los remontados. Así, al final de la fermentación alcohólica el contenido de resveratrol está comprendido entre 0.004 y 0.006 g/L. Después, durante la fermentación alcohólica y durante el tiempo en bodega, el contenido fluctúa continuamente, obteniendo una concentración final de 0.006 g/L.

La técnica de RMN cuantitativa, se muestra, por lo tanto, como una importante herramienta para la cuantificación simultánea de numerosos compuestos de vital importancia para la obtención de un vino de calidad.

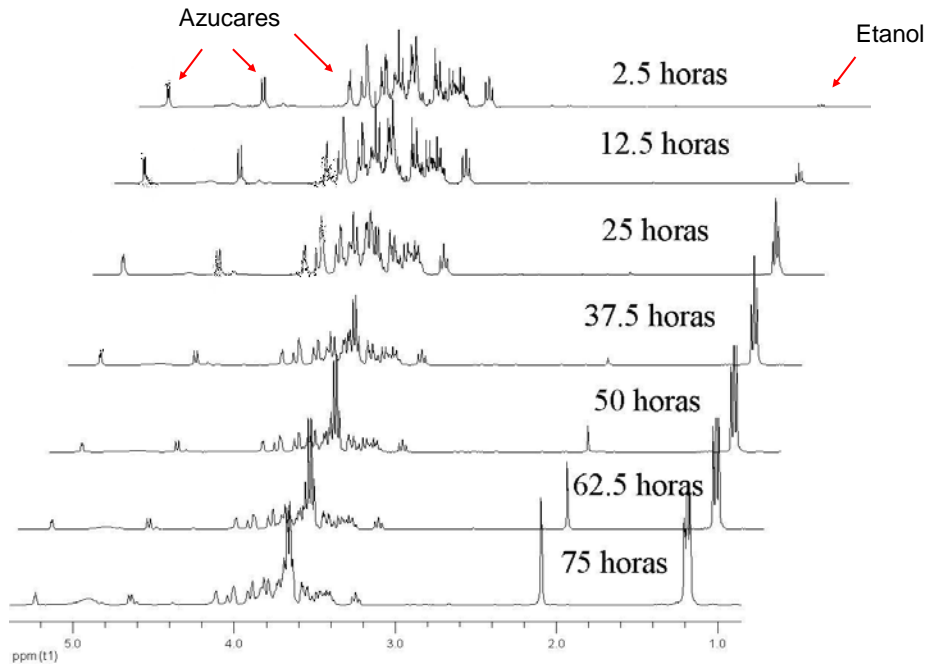
#### 4.5. Aplicación de la RMN cuantitativa al seguimiento de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN

Con los buenos resultados obtenidos a la hora de hacer el seguimiento de la elaboración de vinos en bodega, se decidió abordar la cuantificación de diversos componentes en fermentaciones realizadas en el propio tubo de RMN en el equipo de resonancia de la Universidad de La Rioja. En este primer trabajo, se puso a punto la metodología de microfermentaciones alcohólicas a temperatura controlada y con toma de datos de forma continua. Cabe destacar que el principal problema que entraña este análisis es el de llevar a cabo de forma correcta la fermentación alcohólica en un tubo de RMN de 5 mm de diámetro y con un volumen final de 0.45 mL de mosto.

La uva procede de la finca Vista Hermosa del término municipal de Tudelilla y corresponde a una variedad garnacha de 20 años. El mosto se obtuvo tras un despalillado total con doce horas de maceración y un posterior sangrado. Una vez decantado el mosto se inoculó con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, Uvaferm BC<sup>®</sup>, 40 mg en 60 mL) y se cogieron 0.45 mL de mosto a los que se les añadió 0.05 mL de D<sub>2</sub>O (relación H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1). La muestra fue introducida en un tubo de RMN cerrándolo con un tapón perforado con la finalidad de permitir la salida del dióxido de carbono.

Los espectros de RMN de protón se realizaron directamente sobre la muestra de vino con la preparación comentada anteriormente, utilizando el programa de pulsos explicado en el apartado de material y métodos para la cuantificación en el RMN de 400 MHz para protón. La temperatura se mantuvo constante a 26 °C (299 K). Se realizaron 30 experimentos de forma continua con una duración de cada experimento de 2 h y 30 min empleando el programa auxiliar de Bruker multizg.

Conforme se realizaron los experimentos, se fueron monitorizando para comprobar la evolución de la fermentación alcohólica. En la Figura 4.31 se muestran siete espectros de RMN de protón, desde las 2 horas y media hasta las 75 horas, observando claramente la evolución de las señales de etanol y la disminución de las señales correspondiente a los azúcares.

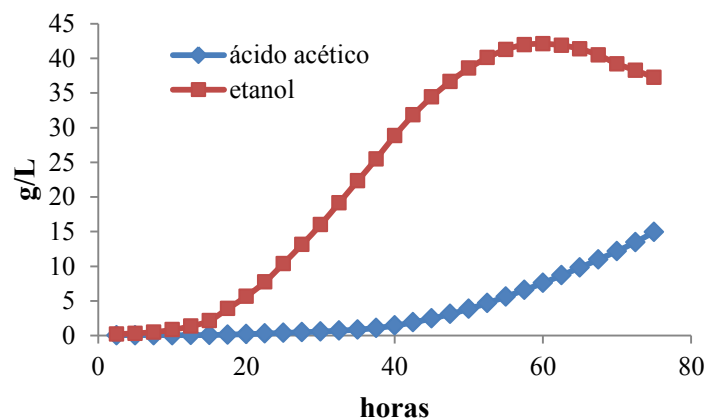


**Figura 4.31.** Seguimiento de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN.

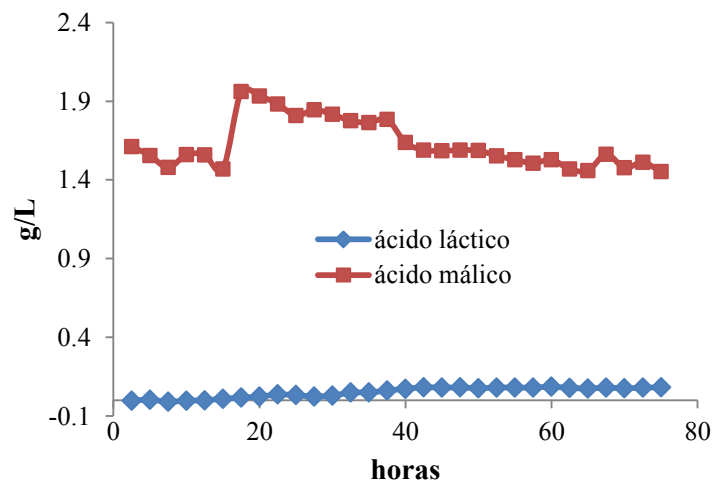
Los espectros, una vez registrados, fueron tratados siguiendo el protocolo puesto a punto en este capítulo para la correcta cuantificación. Dicha cuantificación se efectuó mediante la metodología del patrón externo.

En las Figura 4.32 y Figura 4.33 se muestran los datos de la evolución del etanol y los ácidos acético, málico y láctico. Se observa claramente, que dada las condiciones de microfermentación en el tubo de RMN, la aparición de gran cantidad de acético frena la progresión del etanol. Con los mismos experimentos se

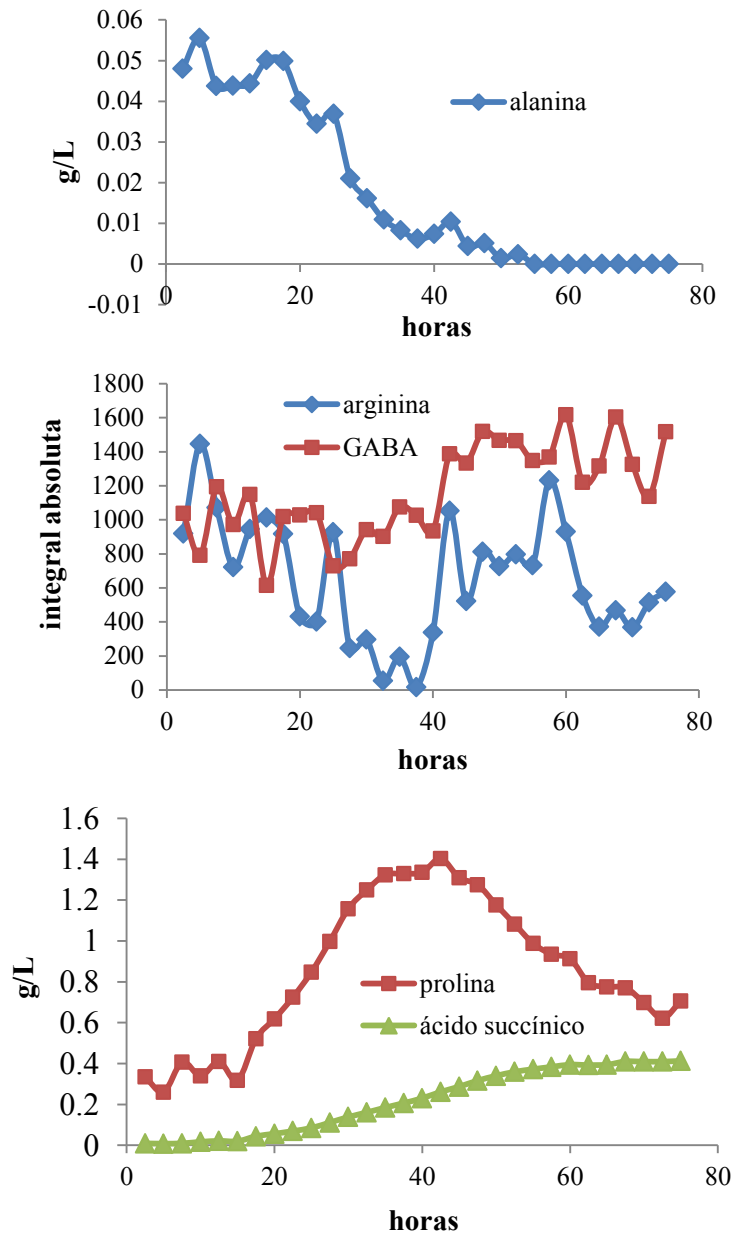
podieron realizar los análisis de otros compuestos como los que aparecen en la Figura 4.34. Los aminoácidos alanina y prolina y el ácido succínico pudieron ser cuantificados, mientras que para los aminoácidos arginina y GABA se dan los valores de las integrales absolutas.



**Figura 4.32.** Evolución del etanol y del ácido acético expresados en g/L.



**Figura 4.33.** Evolución de los ácidos málico y láctico expresados en g/L.



**Figura 4.34.** Evolución de los aminoácidos a) alanina b) prolina y del ácido succínico expresados en g/L y de c) arginina y GABA, expresados en integral absoluta.

En este último apartado del capítulo se ha llevado a cabo una microfermentación en un tubo de RMN dentro del espectrómetro, realizando espectros de forma continua para obtener información cuantitativa de la evolución de diversos componentes del vino. Se puede realizar un perfecto seguimiento cinético de diversos compuestos sin necesidad de recoger ni alterar la muestra. En futuros trabajos se tratará de controlar el proceso para que la fermentación alcohólica se realice sin la intervención de procesos colaterales que se han observado en la alta producción de niveles de ácido acético.

Esta metodología puede ser interesante a la hora de estudiar el comportamiento de determinados microorganismos frente a importantes compuestos que determinan la calidad del vino. Así, de un modo simple y rápido se puede recoger numerosa información de todo el proceso de fermentación.

Como resumen, en este capítulo hemos puesto a punto la técnica de RMN de protón para el seguimiento cuantitativo del proceso de vinificación. Tanto la fermentación alcohólica como la maloláctica y el envejecimiento en barrica pueden controlarse por RMN de protón a través del seguimiento cuantitativo de los principales metabolitos involucrados en el proceso. También se ha puesto a punto esta metodología en la motorización de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN con apenas 450  $\mu\text{L}$  de vino.



## Capítulo 5

### La resonancia magnética nuclear de protón y métodos quimiométricos

#### 5.1. Aplicación de la RMN de protón y la quimiometría al estudio de la trazabilidad de mostos y vinos de la D.O.Ca. Rioja

*5.1.1. Introducción y antecedentes*

*5.1.2. Espectros de RMN de protón de las  
muestras de las cooperativas*

*5.1.3. Empleo del análisis de componentes  
principales (PCA)*

*5.1.4. Empleo del análisis de variables canónicas  
extendidas de intervalos (iECVA)*



## 5.1. Aplicación de la RMN de protón y la quimiometría al estudio de la trazabilidad de mostos y vinos de la D.O.Ca. Rioja

### 5.1.1. Introducción y antecedentes

La caracterización de la trazabilidad y la autenticidad de alimentos está dirigida hacia la protección del consumidor y de los productores, con el fin de evitar fraudes. En los últimos años, los consumidores han mostrado un nuevo interés hacia los alimentos que están fuertemente asociados a su lugar de origen.<sup>1,2</sup> En concreto, la trazabilidad y la autenticidad del vino ha sido ampliamente investigada en los últimos años.

Además, el vino puede ser fácilmente adulterado debido a su compleja composición química<sup>3</sup> que depende de numerosos factores, tales como la variedad de la uva, las condiciones medioambientales y las prácticas enológicas. Estos factores tienen una gran influencia en la calidad del vino y son muy importantes a la hora de caracterizar y diferenciar entre regiones específicas, como las denominaciones de origen. Así, los consumidores están más orientados a la adquisición de vinos con certificado de autenticidad y de origen de producción (Figura 5.1).

---

<sup>1</sup> Luykx, D. M. A. M.; van Ruth, S. M., *Food Chem.* **2008**, *107*, 897–911.

<sup>2</sup> Reid, L. M.; O'Donnell, C. P.; Downey, G., *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, *17*, 344–353.

<sup>3</sup> Lees, M., *Food Authenticity and Traceability*. CRC Press: 2003.



**Figura 5.1.** Esquema sobre la trazabilidad de un vino.

La prueba de autenticidad del vino mediante RMN fue puesta a punto por Martin y sus colaboradores,<sup>4</sup> que desarrollaron el empleo de la RMN de isótopos de deuterio para detectar fraudes como la adición de azúcar al vino y la realización de mezclas de vinos. En la actualidad, hay una gran variedad de técnicas analíticas empleadas para la identificación de la autenticidad de los vinos debido al enorme interés que existe por garantizar la calidad y origen del vino.

Recientemente, mediante la metabolómica,<sup>5,6</sup> se ha demostrado que el estudio del perfil metabólico de un vino es un método eficaz para explorar y detectar cambios metabólicos, que a su vez pueden ser utilizados para comparar, distinguir y clasificar muestras.<sup>7,8,9</sup> Brescia y sus colaboradores<sup>10</sup> utilizaron el análisis con RMN para detectar el origen geográfico de 41 vinos tintos procedentes de varias

<sup>4</sup> Martin, G. J.; Guillou, C.; Martin, M. L.; Cabanis, M. T.; Tep, Y.; Aerny, J., *J. Agric. Food Chem.* **1988**, *36*, 316–322.

<sup>5</sup> Wishart, D. S., *Trends Food Sci. Tech.* **2008**, *19*, 482–493.

<sup>6</sup> Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E. *Handbook of metabonomics and metabolomics*. 1ª Ed, Elsevier 2007.

<sup>7</sup> Alberti, E.; Belton, P. S.; Gil, A. M., *Annual Reports on NMR Spectroscopy* **2002**, *47*, 109–148.

<sup>8</sup> Larsen, F. H.; van den Berg, F.; Engelsens, S. B., *J. Chemom.* **2006**, *20*, 198–208.

<sup>9</sup> Kidrič, J., *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2008**, *64*, 161–171.

<sup>10</sup> Brescia, M. A.; Caldarola, V.; De Giglio, A.; Benedetti, D.; Fanizzi, F. P.; Sacco, A., *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 177–186.

bodegas situadas en la región de Apulia (Italia). Gaudillere y sus colaboradores<sup>11,12,13</sup> demostraron que la combinación de la RMN de protón con métodos quimiométricos, mediante análisis estadístico multivariante, podía ser utilizado para discriminar entre muestras de uvas procedentes de diferentes zonas de producción (*terroir*) situados en el sureste de Francia (Burdeos).

En un estudio similar, Son y sus colaboradores<sup>14</sup> demostraron que se podía distinguir entre uvas y vinos procedentes de diferentes zonas geográficas de Corea mediante la utilización del análisis de componentes principales (PCA) y del análisis discriminante sobre la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS\_DA). Con esta metodología demostraron que las uvas cultivadas en regiones con alta exposición al sol y poca lluvia tenían mayores niveles de azúcar, prolina, sodio, calcio y menores niveles de ácido málico, ácido cítrico, alanina y treonina, que las cultivadas en regiones con la exposición al sol relativamente baja y la alta precipitación.

En este contexto, el estudio de la identificación geográfica de vinos llega a ser aún más interesante cuando se refiere a una pequeña zona de producción o *terroir*.<sup>15</sup> La palabra *terroir* viene de la palabra francesa *terre* y es usada para describir las características especiales de un cultivo en relación al suelo, las condiciones climáticas y las técnicas agrícolas, contribuyendo todo ello a la calidad única del cultivo. La necesidad de redescubrir los verdaderos valores de la

---

<sup>11</sup> Pereira, G. E.; Gaudillere, J. P.; Van Leeuwen, C.; Hilbert, G.; Lavialle, O.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D., *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6382–6389.

<sup>12</sup> Pereira, G. E.; Gaudillere, J. P.; Pieri, P.; Hilbert, G.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6765–6775.

<sup>13</sup> Pereira, G. E.; Gaudillere, J. P.; Leeuwen, C. V.; Hilbert, G.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D., *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 346–352.

<sup>14</sup> Son, H. S.; Hwang, G. S.; Kim, K. M.; Ahn, H. J.; Park, W. M.; van den Berg, F.; Hong, Y. S.; Lee, C. H., *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1481–1490.

<sup>15</sup> Van Leeuwen, C. F., P.; Choné, X.; Tregoat, O.; Koundouras, S.; Dubourdieu, D., *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*, 207–217.

agricultura estrictamente relacionados con el *terroir*, ha llevado a establecer etiquetas de certificado de calidad y origen como estrategia para diferenciarse, y a su vez, aporta a los productos alimenticios un valor comercial añadido. Así, los vinos de calidad son a menudo producidos en áreas restringidas definidas como denominaciones de origen (D.O.).

En España existen 69 denominaciones de origen, de las cuales la de Rioja es una de las más antiguas, que además de certificar el origen de producción de sus vinos también certifica la calidad de los mismos. Por eso junto a la denominación del Priorato, son las únicas denominaciones que se denotan como Denominación de Origen Calificada, y de ahí sus siglas, D.O.Ca. Rioja.

La D.O.Ca. Rioja es una pequeña zona de producción localizada en el norte de España con 635.93 Km<sup>2</sup> de viñedo dividido en 3 diferentes sub-zonas (Figura 5.2); Rioja Alta (267.86 Km<sup>2</sup>), Rioja Alavesa (129.34 Km<sup>2</sup>) y Rioja Baja (238.73 Km<sup>2</sup>). La variedad de uva principal de esta zona de producción es el tempranillo (*vitis vinifera*).

Esta región se beneficia de la confluencia de dos climas opuestos, el Atlántico y el Mediterráneo, que conceden temperaturas moderadas y unas precipitaciones anuales de poco más de 400 L/m<sup>2</sup>. Estas condiciones junto con la estructura equilibrada de sus suelos (arenas, limos y arcillas), hacen que sea una zona ideal para el cultivo de uva.

Dentro de la D.O.Ca. Rioja un parámetro muy importante es la calidad de la añada, ya que cada cosecha se califica en términos de excelente, muy buena, buena, normal o mediana. Con estas calificaciones se intenta orientar al consumidor sobre la calidad del vino.

Como se ha podido leer en el Capítulo 4, a lo largo de esta tesis se ha desarrollado un método cuantitativo para evaluar el proceso fermentativo del vino, cuantificando los ácidos málico, láctico, acético y succínico, los aminoácidos prolina y alanina, y el etanol en vinos de la Rioja Alta (Bodegas Dinastía Vivanco y Bodegas Patrocinio S.C.L.).<sup>16,17</sup>

Ahora el siguiente objetivo de este trabajo es estudiar el proceso de vinificación en Rioja empleando la RMN de protón junto a métodos de quimiometría avanzada,<sup>18,19</sup> con el fin de encontrar los metabolitos responsables de la diferenciación de las muestras en función de diferentes parámetros. Por ejemplo, el momento en el que se encuentren a lo largo del proceso de vinificación, los años o cosechas de producción de los vinos y el origen del vino, tanto diferenciando entre sub-zonas de la denominación como entre bodegas.

### 5.1.2. Espectros de RMN de protón de las muestras de las cooperativas

Se seleccionaron un total de nueve bodegas cooperativas pertenecientes a la D.O.Ca. Rioja, localizadas en las tres sub-zonas, tres de ellas en la Rioja Baja (Aldeanueva de Ebro, Alcanadre y Arnedo), cinco en la Rioja Alta (Haro, San Asensio, Navarrete, Arenzana de Abajo y Uruñuela) y una en la Rioja Alavesa (Labastida) (Figura 5.2). Las muestras fueron recogidas en tres cosechas consecutivas: 2006, 2007 y 2008. Durante el 2006, se recogieron cinco muestras de cada una de las cooperativas correspondientes con cinco momentos diferentes a lo largo del proceso de vinificación:

---

<sup>16</sup> Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M., *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4715–4720.

<sup>17</sup> López-Rituerto, E.; Cabredo, S.; López, M.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M., *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2112–2118.

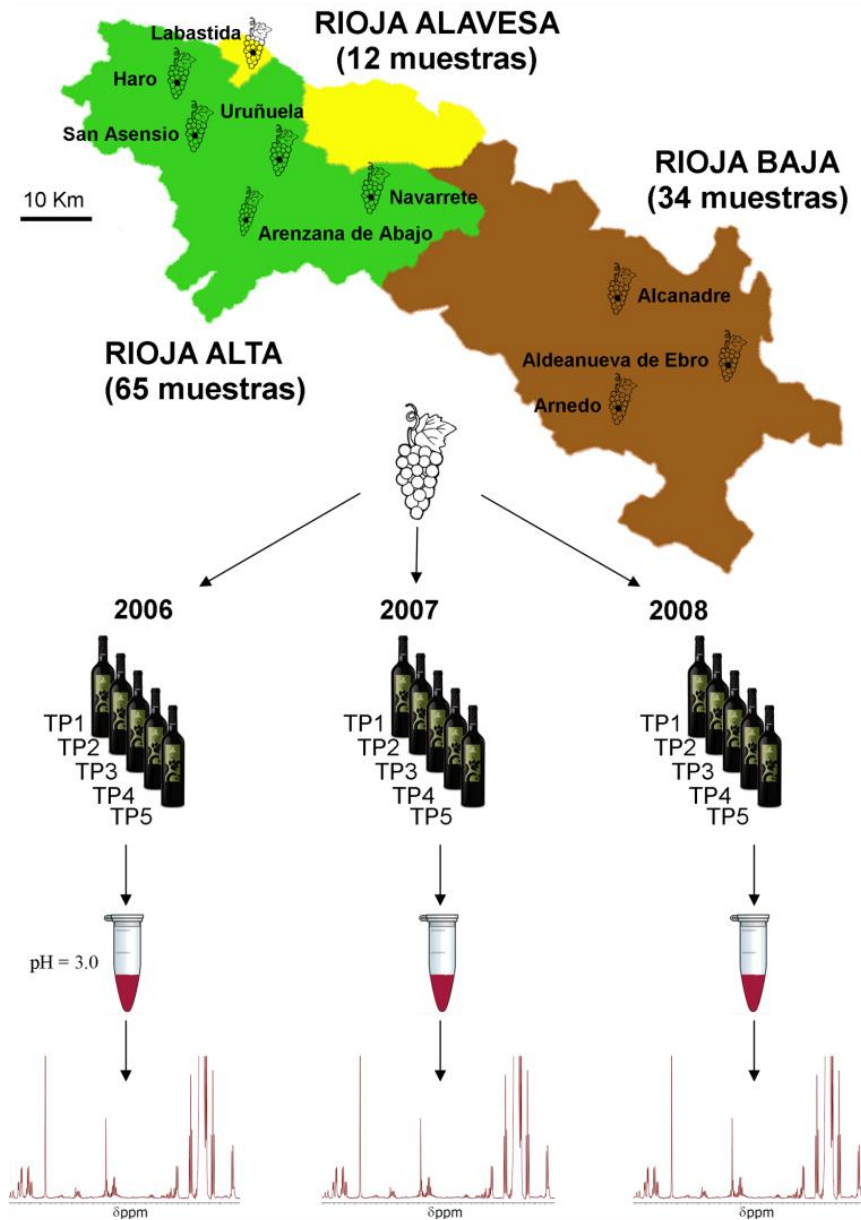
<sup>18</sup> Munck, L.; Nørgaard, L.; Engelsen, S. B.; Bro, R.; Andersson, C. A., *Chemometr. Intell. Lab.* **1998**, *44*, 31–60.

<sup>19</sup> Saurina, J., *Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 234–245.

1. Antes de comenzar la fermentación alcohólica.
2. Al final de la fermentación alcohólica.
3. Al comienzo de la fermentación maloláctica.
4. Durante la fermentación maloláctica.
5. Al final de la fermentación maloláctica.

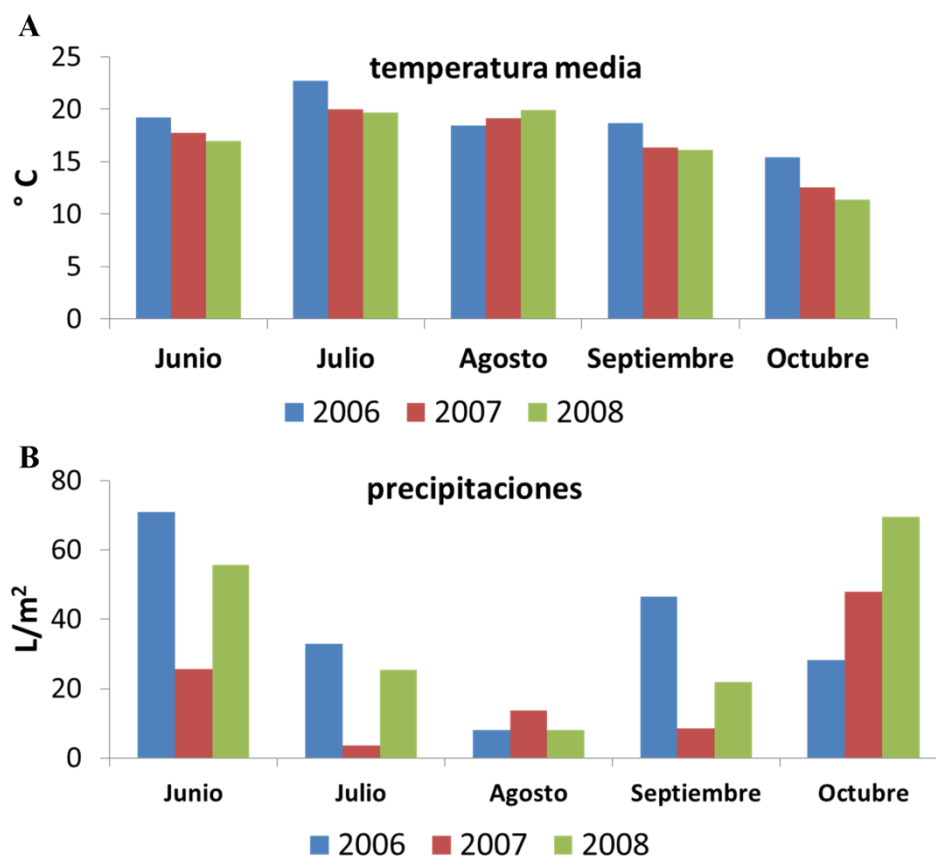
En 2007, se recogieron los cinco mismos momentos de las bodegas situadas en Arnedo, Arenzana de Abajo, Navarrete, Haro y Uruñuela, y sólo cuatro momentos de las bodegas de Aldeanueva de Ebro y Labastida. Para finalizar, en 2008 se tomaron muestras en los cinco momentos de las bodegas de Arnedo, Aldeanueva de Ebro, Arenzana de Abajo, Navarrete, Haro y Uruñuela, y tres momentos de la bodega de Labastida.





**Figura 5.2.** Sub-zonas geográficas de la D.O.Ca. Rioja con la localización de los viñedos y un resumen gráfico del diseño experimental.

En total fueron 111 muestras que representan tres cosechas, nueve bodegas cooperativas y cinco diferentes momentos a lo largo del proceso de vinificación. Las condiciones climáticas<sup>20</sup> de los tres años se pueden ver en la Figura 5.3, observándose las temperaturas moderadas y las precipitaciones no excesivas, típicas de esta región.



**Figura 5.3.** Gráficos de temperatura media y precipitaciones a lo largo de los años de estudio, 2006, 2007 y 2008, expresados en °C y L/m<sup>2</sup>, respectivamente.

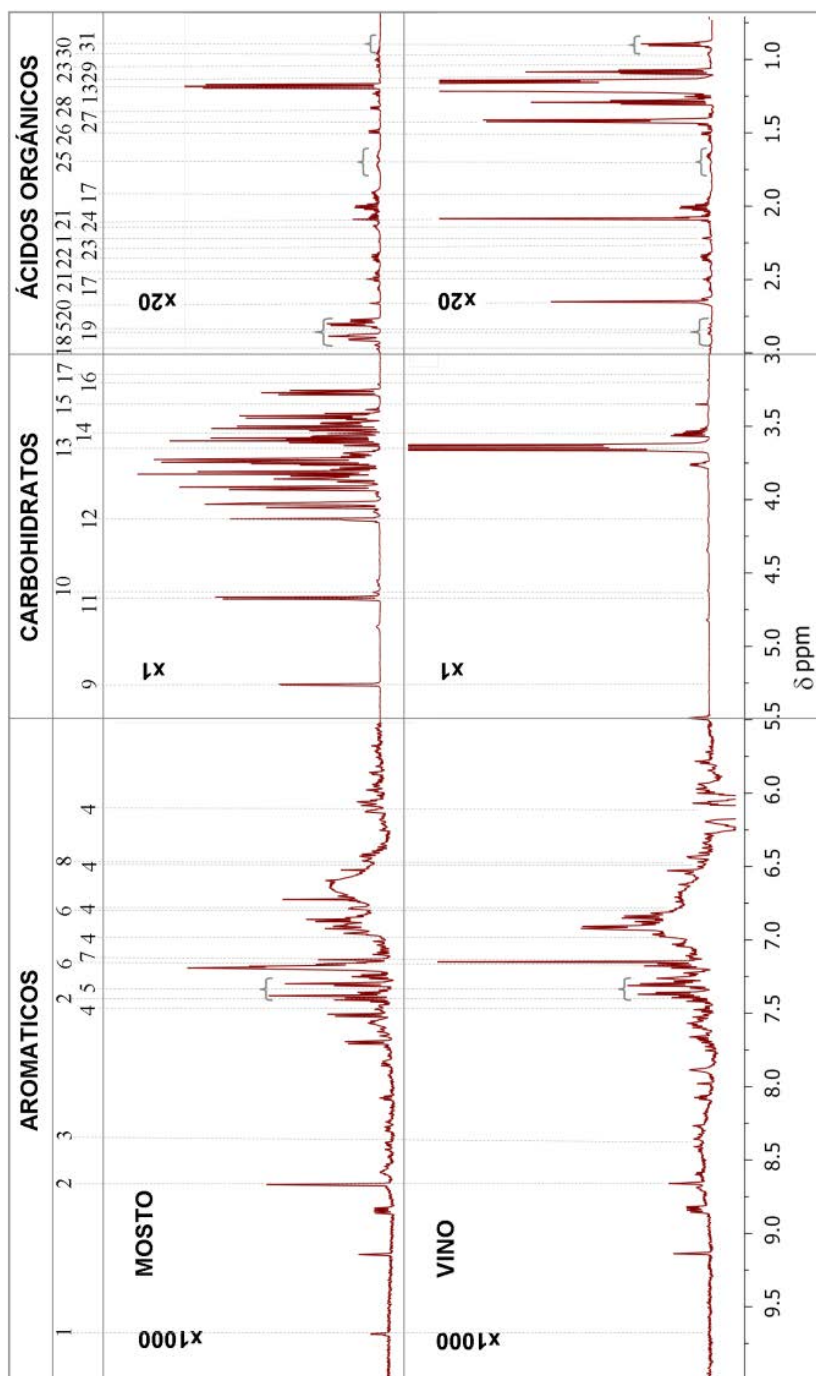
<sup>20</sup> <http://www.larioja.org/npRioja/default/defaultpage.jsp?idtab=444754> (activa a fecha 6-2-2012).

Las muestras fueron recogidas directamente de los depósitos de fermentación, transportadas al laboratorio y congeladas a -25 °C hasta su análisis. De este modo, se aseguraba que las levaduras y las bacterias detuvieran su actividad.

La preparación de la muestra se realizó siguiendo la metodología explicada en el capítulo 3, de material y métodos en el apartado 3.1.3.3.

Como hemos visto, los espectros de RMN de protón de las muestras van cambiando a medida que el mosto se va convirtiendo en vino. En la Figura 5.1, se puede ver un espectro de un mosto y otro de un vino subdividido en tres zonas correspondientes a compuestos aromáticos, a carbohidratos y a ácidos orgánicos. En la misma figura, también están indicados los metabolitos presentes en el mosto, en el vino o en ambas muestras (metabolitos del 1-31) que están asignados en la Tabla 5.1.





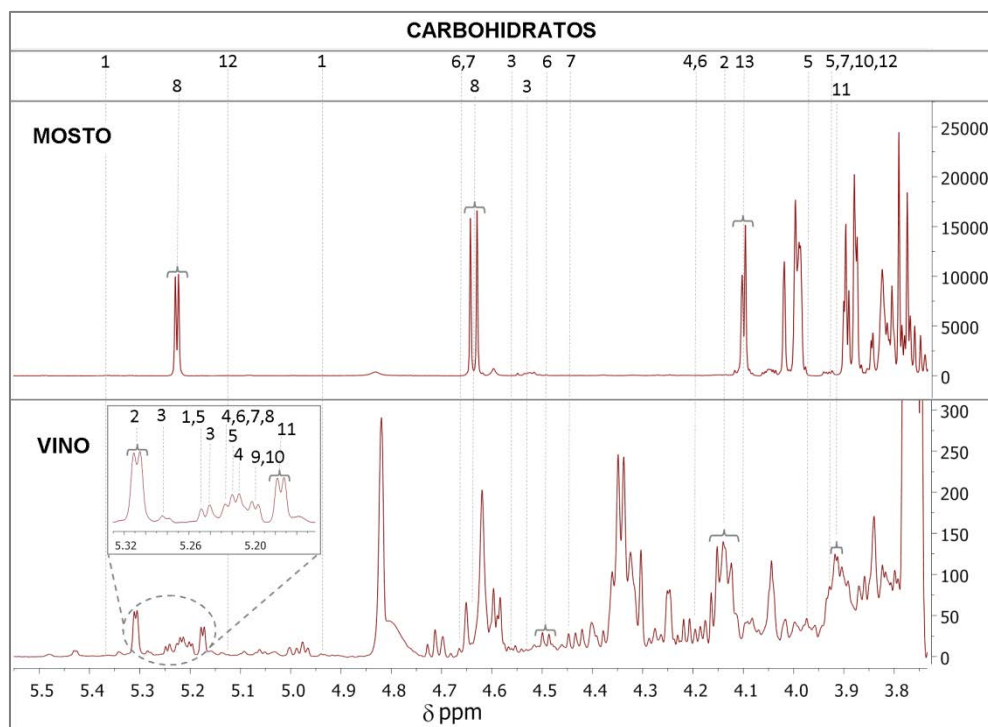
**Figura 5.1.** Espectro de RMN de protón de un mosto y un vino. Asignación de las señales de la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1.** Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento (Hz) de compuestos presentes en el mosto y el vino identificados a través de referencias bibliográficas y mediante comparación de espectros de muestras con estándares añadidos.

n°	Compuesto <sup>(a)</sup>	desplazamiento químico ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento (Hz)	grupo
1	etanal	9.66 (s), 2.22 (s)	CH, CH <sub>3</sub>
2	histidina	8.66 (s), 7.39 (s)	CH, CH
3	ácido fórmico	8.36 (s)	CH
4	resveratrol	7.39 (d, $J=8.2$ ), 7.01 (d, $J=16.7$ ), 6.86-6.82 (m), 6.53 (d, $J=13.1$ ), 6.24 (d, $J=8.1$ )	CH, CH, CH, CH, CH
5	2-feniletanol	7.37 (t, anillo), 7.29 (dd, anillo), 2.85 (t, $J=6.8$ , $J=6.8$ )	CH, CH, CH <sub>2</sub>
6	tirosina	7.18 (d, $J=8.5$ ), 6.88 (d, $J=8.4$ )	CH, CH
7	ácido gálico	7.15 (s)	CH
8	ácido fumárico	6.52 (s)	CH
9	$\alpha$ -glucosa	5.23 (d, $J=7.95$ )	CH
10	ácido tartárico	4.60 (s)	CH
11	$\beta$ -glucosa	4.64 (d, $J=3.74$ )	CH
12	$\alpha,\beta$ -fructosa	4.10 (d, $J=3.74$ )	CH
13	etanol	3.68 (q, $J=7.3$ ), 1.17 (t, $J=7.3$ )	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>
14	glicerol	3.57-3.49 (m)	CH <sub>2</sub>
15	metanol	3.35 (s)	CH <sub>3</sub>
16	colina	3.19 (s)	CH <sub>3</sub>
17	GABA	3.13-3.09 (m), 2.49 (t, $J=7.28$ , $J=7.28$ ), 1.96 -1.87 (m)	CH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub>
18	ácido cítrico	2.96 (d, $J=15.7$ )	CH
19	ácido málico	2.84 (dd, $J=8.0$ , $J=16.4$ )	CH <sub>2</sub>
20	ácido succínico	2.65 (s)	CH <sub>2</sub>
21	glutamina	2.48-2.42 (m), 2.15-2.11 (m)	CH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub>
	ácido glutámico	2.46-2.39 (m), 2.14-2.11 (m)	CH <sub>2</sub> , CH <sub>2</sub>
22	prolina	2.38-2.31 (m)	CH <sub>2</sub>
23	valina	2.31-2.25 (m), 1.05 (d, $J=7.0$ ), 0.99 (d, $J=7.0$ )	CH, CH <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub>
24	ácido acético	2.08 (s)	CH <sub>3</sub>
25	arginina	1.60-1.69 (m)	CH <sub>2</sub>
26	alanina	1.48 (d, $J=7.4$ )	CH <sub>3</sub>
27	ácido láctico	1.40 (d, $J=6.8$ )	CH <sub>3</sub>
28	treonina	1.33 (d, $J=6.6$ )	CH <sub>3</sub>
29	2,3-butanodiol	1.13 (d, $J=6.3$ )	CH <sub>3</sub>
30	leucina	0.95 (d, $J=6.8$ )	CH <sub>3</sub>
31	isobutanol	0.87 (d, $J=6.7$ )	CH <sub>3</sub>
	isopentanol	0.88 (d, $J=6.8$ )	CH <sub>3</sub>
	1-propanol	0.88 (t, $J=7.5$ , $J=7.5$ )	CH <sub>3</sub>

(a) 8, 11, 17, 21-26

Sin embargo, los carbohidratos no desaparecen completamente en el vino. En la Figura 5.4 se pueden ver al menos trece monosacáridos y disacáridos diferentes que están asignados en la Tabla 5.2 y que comúnmente se conocen como los azúcares residuales del vino.



**Figura 5.4.** Espectro de RMN de protón de un mosto y un vino. Asignación de las señales de la tabla 4.1.

<sup>21</sup> Nilsson, M.; Duarte, I. F.; Almeida, C.; Delgadillo, I.; Goodfellow, B. J.; Gil, A. M.; Morris, G. A., *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3736–3743.

<sup>22</sup> Košir, I. J.; Kidrič, J., *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 50–56.

<sup>23</sup> Košir, I. J.; Kidrič, J., *Anal. Chim. Acta* **2002**, *458*, 77–84.

<sup>24</sup> Son, H. S.; Hwang, G. S.; Kim, K. M.; Kim, E. Y.; van den Berg, F.; Park, W. M.; Lee, C. H.; Hong, Y. S., *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1137–1145.

<sup>25</sup> Mattivi, F.; Reniero, F.; Korhammer, S., *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1820–1823.

<sup>26</sup> Ali, K.; Maltese, F.; Toepfer, R.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R., *J. Biomol. NMR* **2011**, 1–12.

**Tabla 5.2.** Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento (Hz) de carbohidratos presentes en el mosto y el vino identificados a través de referencias bibliográficas y mediante comparación de espectros de muestras con estándares añadidos.

n°	compuesto	desplazamiento químico ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento (Hz)	intervalo de concentración (mg/L)
1	ribosa	<b>5.38</b> (d, $J=3.7$ ), <b>5.25</b> (d, $J=1.7$ ), <b>4.93</b> (d, $J=6.5$ ), <b>4.16-4.07</b> (m)	3.90-28.1
2	desconocido	<b>5.31</b> (d, $J=3.7$ )	
3	arabinosa	<b>5.30</b> (d, $J=4.3$ ), <b>5.24</b> (d, $J=3.5$ ), <b>4.52</b> (d, $J=7.8$ )	5.00-144
4	fucosa	<b>5.28</b> (d, $J=4.3$ ), <b>5.23</b> (d, $J=2.9$ ), <b>5.21</b> (d, $J=3.8$ ), <b>4.56</b> (d, $J=7.9$ ), <b>4.22-4.15</b> (m)	0.130-320
5	galactosa	<b>5.25</b> (d, $J=3.6$ ), <b>5.22</b> (d, $J=3.2$ ), <b>3.98</b> (d, $J=3.1$ ), <b>3.93</b> (d, $J=3.3$ )	5.80-124
6	gentibiosa	<b>5.23</b> (d, $J=3.7$ ), <b>4.66</b> (d, $J=7.9$ ), <b>4.50</b> (t, $J=7.5$ , $J=7.5$ ), <b>4.24-4.11</b> (m)	13.8-18.4
7	lactosa	<b>5.23</b> (d, $J=3.7$ ), <b>4.67</b> (d, $J=7.9$ ), <b>4.45</b> (d, $J=7.8$ ), <b>3.94</b> (d, $J=3.1$ )	5.2-7.2
8	glucosa	<b>5.23</b> (d, $J=7.95$ ), <b>4.64</b> (d, $J=3.74$ )	1.64-30.1
9	trehalosa	<b>5.20</b> (d, $J=3.8$ )	3.4-132
10	xilosa	<b>5.20</b> (d, $J=3.6$ ), <b>3.93</b> (dd, $J=5.4$ , $J=11.5$ )	0.24-58.3
11	manosa	<b>5.18</b> (d, $J=1.2$ ), <b>3.96-3.92</b> (m)	2.6-194
12	ramnosa	<b>5.12</b> (d, $J=1.4$ ), <b>3.93</b> (t, $J=2.6$ , $J=2.6$ )	1.14-46.0
	fructosa	<b>4.10</b> (d, $J=3.7$ )	2.9-31.6

(a) 27, 28, 29, 30, 31

<sup>27</sup> Dols-Lafargue, M.; Gindreau, E.; Le Marrec, C.; Chambat, G.; Heyraud, A.; Lonvaud-Funel, A. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9592–9599.

<sup>28</sup> Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10720–10728.

<sup>29</sup> Rovio, S.; Sirén, K.; Sirén, H. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1194–1200.

<sup>30</sup> Ruiz-Matute, A. I.; Sanz, M. L.; Moreno-Arribas, M. V.; Martínez-Castro, I. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7296–7300.

<sup>31</sup> Bernal, J. L.; Del Nozal, M. J.; Toribio, L.; Del Alamo, M. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 507–511.

### 5.1.3. Empleo del análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales es un método fundamental para el estudio exploratorio (sin supervisión) de los datos, que muestra las estructuras intrínsecas de ellos de una forma sencilla y en una proyección ortogonal (Capítulo 3, material y métodos). En él se destacan las similitudes y diferencias entre los grupos, así como las variables que intervienen. Normalmente, los datos sobre los que se trabaja se reducen a unos pocos factores latentes, es decir, los componentes principales (CP), ordenados por importancia (varianza explicada), lo que hace que sea fácil de separar la información útil, evitando cualquier pérdida de información.

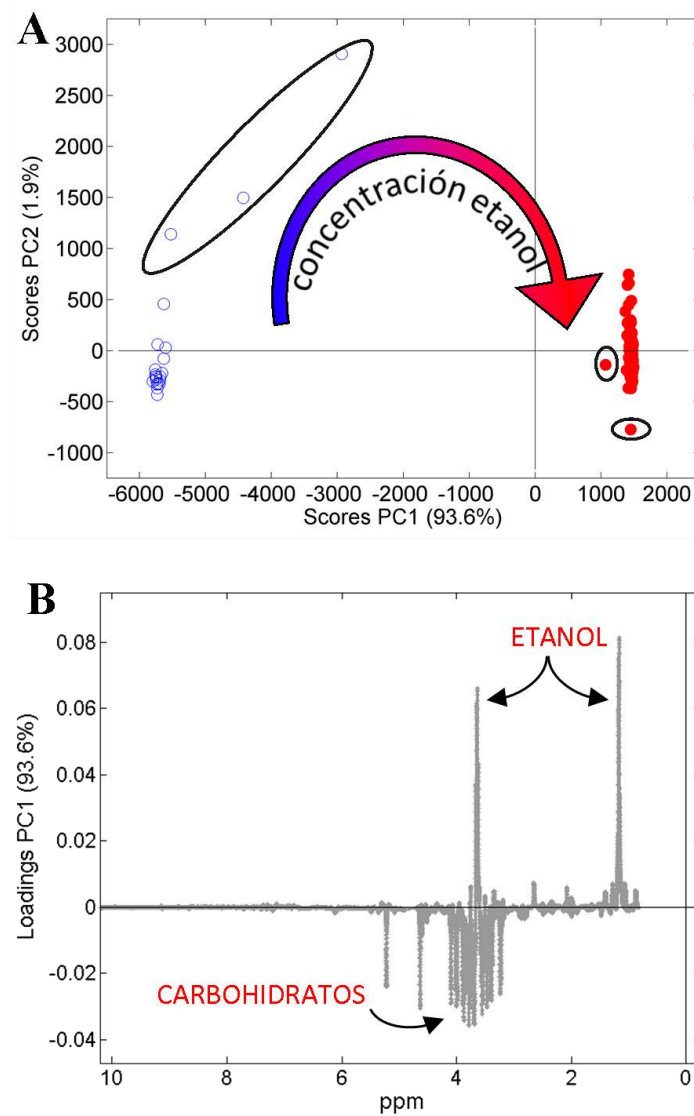
En este trabajo el empleo de esta técnica quimiométrica fue aplicada con el fin de estudiar las similitudes entre las muestras de vino a lo largo del proceso de vinificación, los diferentes años y las distintas regiones de origen.

- **Diferenciación durante el proceso de vinificación**

Como ampliamente se ha explicado en el capítulo de la introducción, durante la elaboración de un vino tinto en Rioja tienen lugar dos procesos fundamentales: la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica. En el primero, los azúcares se transforman en etanol y dióxido de carbono. Y en el segundo, se produce la inversión del ácido málico en ácido láctico, un ácido más débil que aporta suavidad al vino.

Para obtener una idea global sobre las 111 muestras de mosto/vino que fueron recogidas, se realizó un análisis de componentes principales. En la Figura 5.5 se representa el gráfico de dos dimensiones de las dos primeras componentes (a) y los factores de carga o los coeficientes de correlación entre las variables y la componente 1 (b).





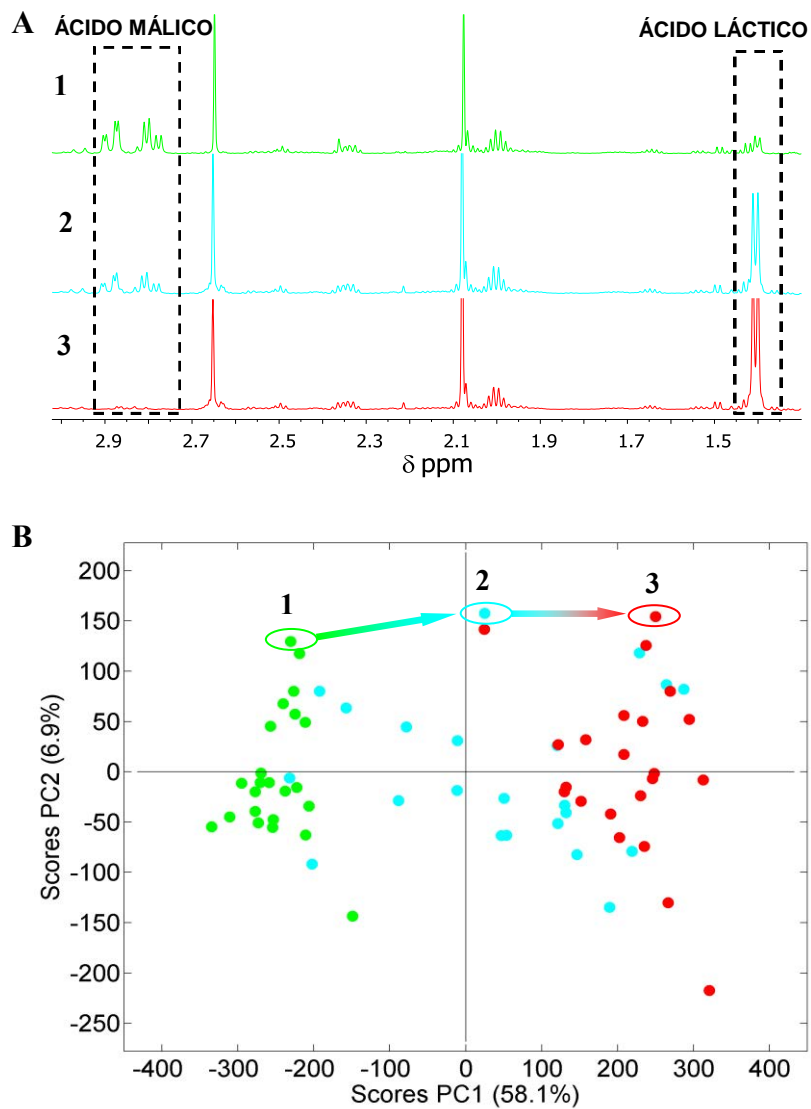
**Figura 5.5.** Análisis de componentes principales (PCA) aplicado sobre los espectros de RMN de protón completos de las 111 muestras de vino y mosto. a) Gráfico de dos dimensiones de las componentes 1 y 2. b) Representación gráfica de las cargas factoriales de la componente 1.

En esta figura se puede observar la completa diferenciación entre las muestras de mosto y vino (cuando la fermentación alcohólica ha finalizado). Sólo cuatro muestras de mosto sufren una desviación del patrón mostrado por los mostos y es debido a que dichas muestras fueron recogidas una vez comenzada la fermentación alcohólica y por lo tanto con menor contenido en azúcares y con presencia de etanol.

A la hora de estudiar la evolución de la fermentación maloláctica se realizó el PCA sobre 67 muestras de vinos. Dichas muestras correspondían con los momentos: 1) final de la fermentación alcohólica, 2) a mitad de la fermentación maloláctica y 3) al final de la fermentación maloláctica. En este caso sólo se tuvo en consideración la parte de los espectros de RMN de protón correspondiente a los ácidos orgánicos (1.3-3.2 ppm).

El cambio más apreciable que tienen lugar a lo largo de este proceso es la transformación del ácido málico (2.84 ppm) a ácido láctico (1.40 ppm) que se puede ver fácilmente en el espectro de RMN de protón (Figura 5.6 a). En la representación gráfica en dos dimensiones del PCA también se evidencian los tres tipos de muestras estudiadas, observándose tres grupos diferentes de datos en función del momento en el que se encuentra en la fermentación maloláctica.

Cabe mencionar que el punto a mitad de la fermentación maloláctica está tomado por la propia bodega y en función de los parámetros que ella utiliza. Es por esto que existe una mayor dispersión en los puntos de este grupo de datos.

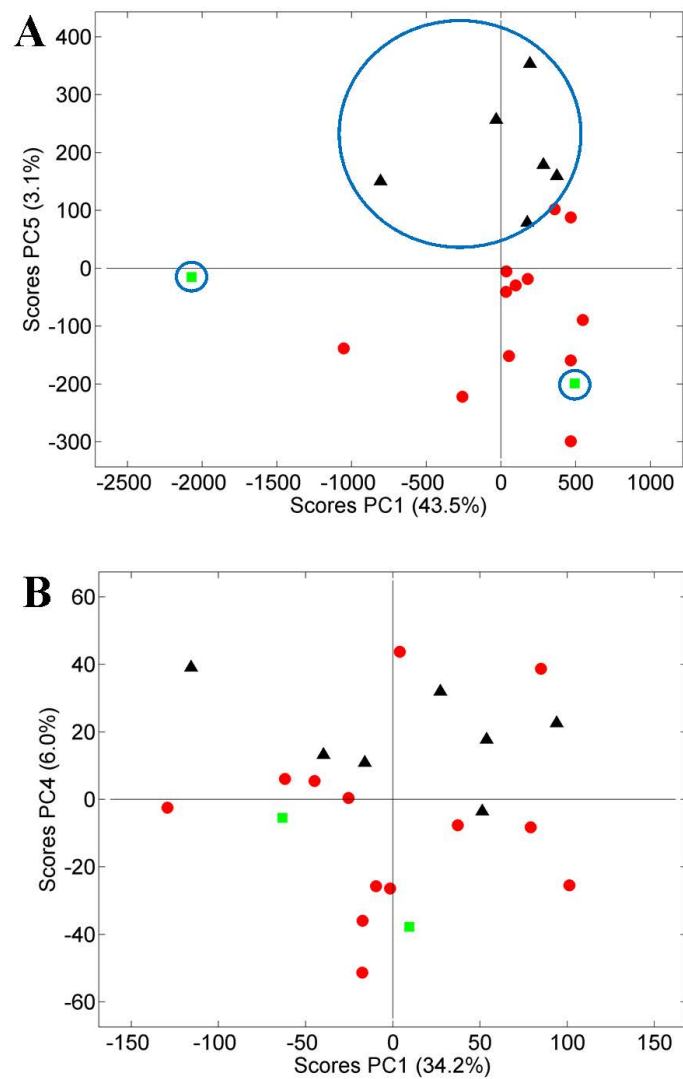


**Figura 5.6.** Evolución de la fermentación maloláctica. a) Espectros de RMN de protón de tres momentos diferentes. b) Gráfico de dos dimensiones del análisis de componentes principales basado en la zona de los ácidos orgánicos (1.3-3.2 ppm) de los espectros de protón de 67 muestras de vino. Las muestras **verdes** corresponden al momento 1, final de la fermentación alcohólica; las **azules** al momento 2, a mitad de la fermentación maloláctica; y los **rojos** al momento 3, final de la fermentación maloláctica.

- **Diferenciación entre sub-zonas de la D.O.Ca. Rioja**

La discriminación entre las tres sub-zonas de Rioja (Rioja Alta, Rioja Baja y Rioja Alavesa) se estudió tanto en muestras de mosto como de vino. En la Figura 5.7 a, se puede observar el gráfico de dos dimensiones de las componentes 1 y 5 basado en 20 muestras de mosto estudiando la zona de los carbohidratos (3.2-5.5 ppm). En él se distinguen dos sub-zonas diferenciadas, la Rioja Baja y la Rioja Alta con la Alavesa. La muestra de la Rioja Alavesa es de Labastida, que se encuentra muy próxima geográficamente de la Rioja Alta. Por tanto, esta es, presumiblemente, la razón por la que las muestras sean tan parecidas.

En el caso de las muestras de vino, el PCA se realizó basándose en 22 muestras, con el vino una vez finalizada la fermentación maloláctica, pero en este caso estudiando la zona de señales correspondientes a compuestos aromáticos (5.5-10.0 ppm). El gráfico de dos dimensiones de las componentes 1 y 4, derivado del PCA que se muestra en la Figura 5.7 b, revela que no es posible hacer una clasificación en firme utilizando un análisis no supervisado sobre estos datos.

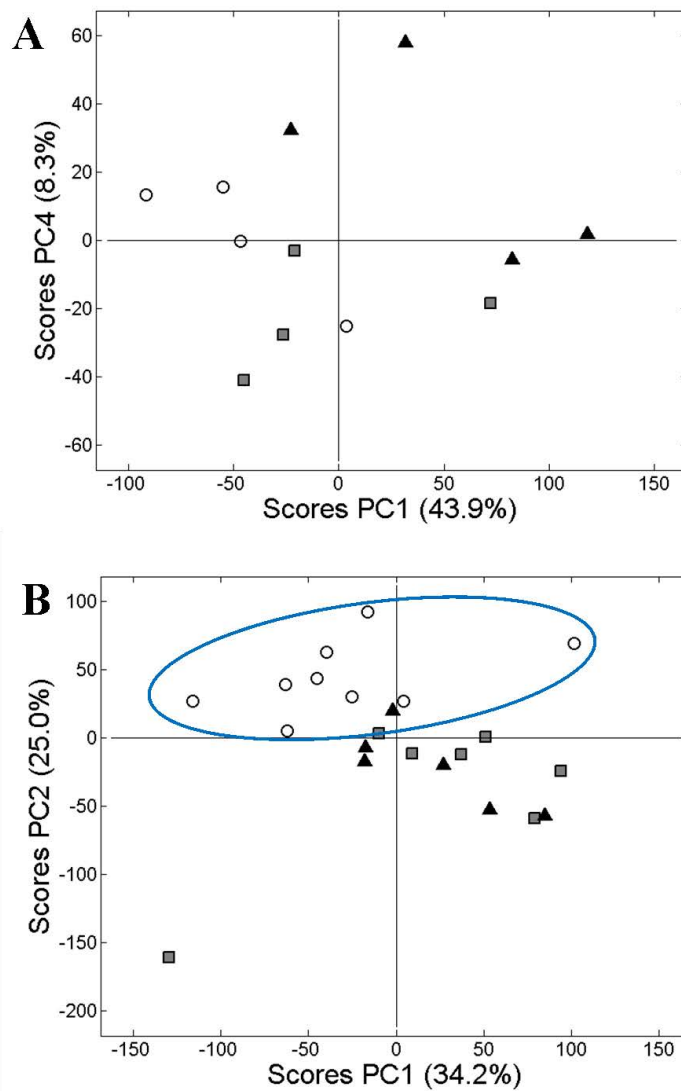


**Figura 5.7.** Representación gráfica de dos dimensiones del PCA derivado de: a) 20 muestras de mosto, con la zona de carbohidratos (3.2-5.5 ppm). Se explica una varianza total del 46.6%. b) 22 muestras de vino basadas en la zona de compuestos aromáticos (5.5-10.0 ppm). Se explica un 40.2% de varianza total. Los triángulos **negros** corresponden a muestras de la Rioja Baja, los cuadrados **verdes** a la Rioja Alavesa y los **rojos** a la Rioja Alta.

- **Diferenciación entre años o cosechas**

También se trató de discriminar, utilizando el análisis de componentes principales, entre las muestras de mosto y vino, basado en el año de producción o cosecha. En la Figura 5.8 a, se muestra el gráfico de dos dimensiones de las componentes 1 y 4 calculado con 12 muestras de mosto de la Rioja Alta, empleando la región de los compuestos aromáticos (5.5-10.0 ppm).

En él se observan tres grupos correspondientes a las tres cosechas 2006, 2007 y 2008, pero proporcionando una discriminación débil. Por el contrario, en la Figura 5.8 b, se puede observar como las muestras del 2006 se distinguen claramente del resto, al realizar el PCA sobre 22 muestras de vino con la zona de los compuestos aromáticos.



**Figura 5.8.** Representación gráfica de dos dimensiones del PCA derivado de: a) 12 muestras de mosto de la Rioja Alta usando la región del espectro de compuestos aromáticos (5.5-10.0 ppm). Se explica un 52.1% de la varianza total. b) 22 muestras de vino de todas las bodegas usando también la zona del espectro de los compuestos aromáticos (5.5-10.0 ppm). Se explica un 59.2% de la varianza total. Los puntos blancos corresponden a las muestras del 2006, los cuadrados grises al 2007 y los triángulos negros al 2008.

#### *5.1.4. Empleo del análisis de variables canónicas extendidas de intervalos (iECVA)*

El ECVA e iECVA son herramientas quimiométricas de clasificación de datos con alta colinealidad, como es el caso de los espectros de RMN. Suelen ser utilizadas para obtener una visión general de la información relevante de los espectros de un determinado grupo de muestras (Capítulo 3, material y métodos).

- **Discriminación entre sub-zonas de la D.O.Ca. Rioja**

Con el fin de examinar el espectro de señales y así obtener la información relevante para distinguir entre las diferentes regiones geográficas, el iECVA se llevó a cabo en el espectro de RMN de protón de los vinos con 100 sub-intervalos de igual tamaño. Teniendo en cuenta la suposición de que las muestras procedentes de Rioja Alta y Alavesa pertenecen al mismo grupo, como sugiere el diagrama de PCA en la Figura 5.7 a y b, se encontró un intervalo capaz de mejorar significativamente la clasificación, estudiando cada año por separado (Figura 5.9, Figura 5.10 y Figura 5.11).

Así, en la representación gráfica del iECVA, para todos los años se observa que el intervalo 54 (5.35-5.25 ppm) puede igualar y reducir el número de clasificaciones con error respecto al modelo global. Este intervalo incluye señales no identificadas de protones anoméricos de un compuesto carbohidrato y en la literatura se ha asignado como un antociano unido a un carbohidrato.<sup>21</sup> Con vinos de la D.O.Ca. Rioja, este compuesto es capaz de discriminar perfectamente entre las diferentes sub-zonas de la denominación en las tres cosechas estudiadas.

En la figuras siguientes, se muestran los gráficos tanto del iECVA como del ECVA correspondientes a las cosechas 2006 (Figura 5.9), 2007 (Figura 5.10) y 2008 (Figura 5.11).

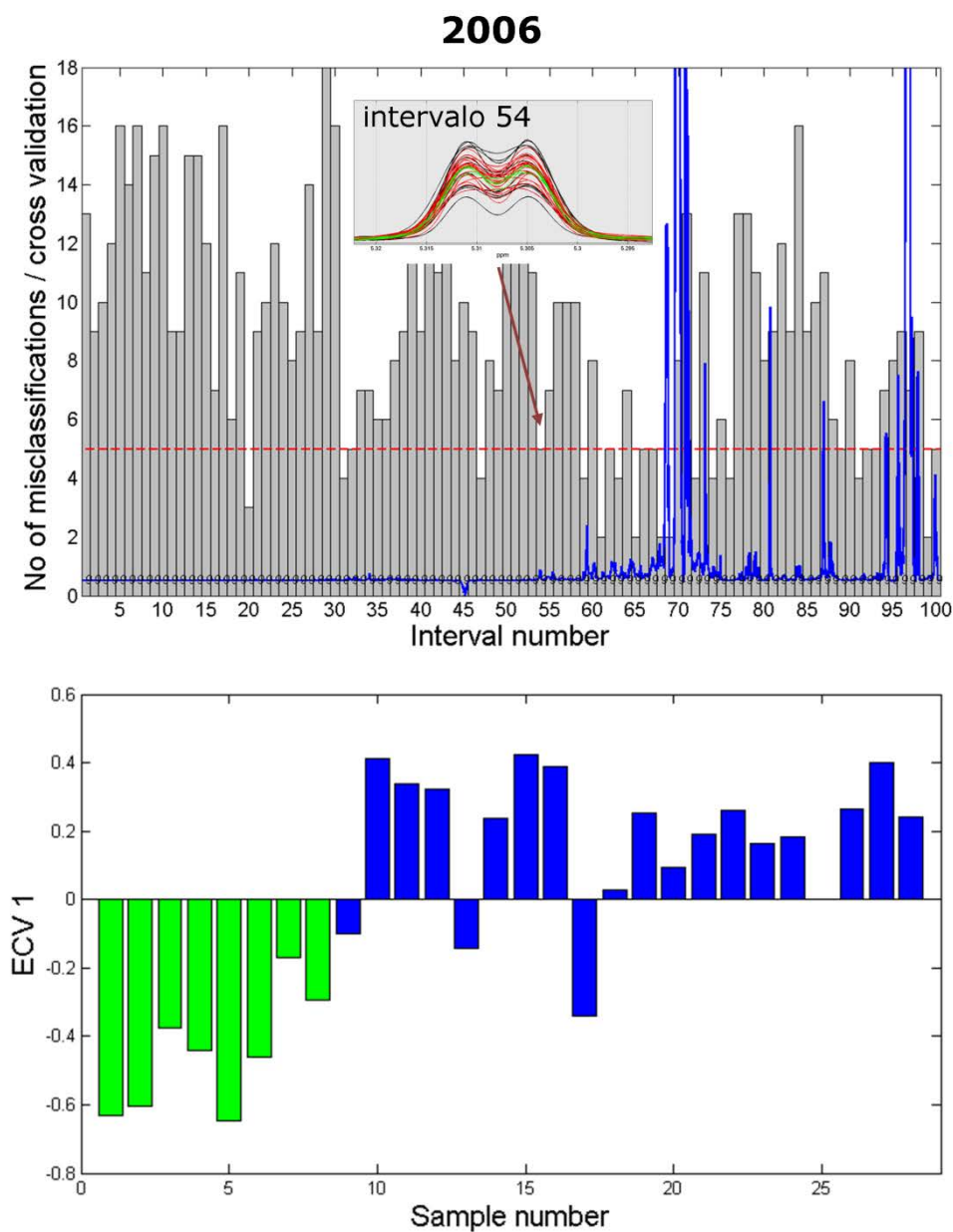


En el primer año, tomando 28 muestras se necesitaron 9 componentes para obtener un número de clasificaciones con error de 5 (17.8% de error). En la Figura 5.9 b se puede ver como todas las barras correspondientes a las muestras de la Rioja Baja (verdes) están distribuidas en la misma dirección y con unos valores bastante altos (la mayoría entre 0.4 y 0.6). En cambio, no todas las barras correspondientes a las muestras de la Rioja Alta y Alavesa (azules), están en la misma dirección. Hay 3 que se encuentran con las verdes aunque con unos valores bastante bajos. Este dato indica que no están muy lejos de los de su grupo.

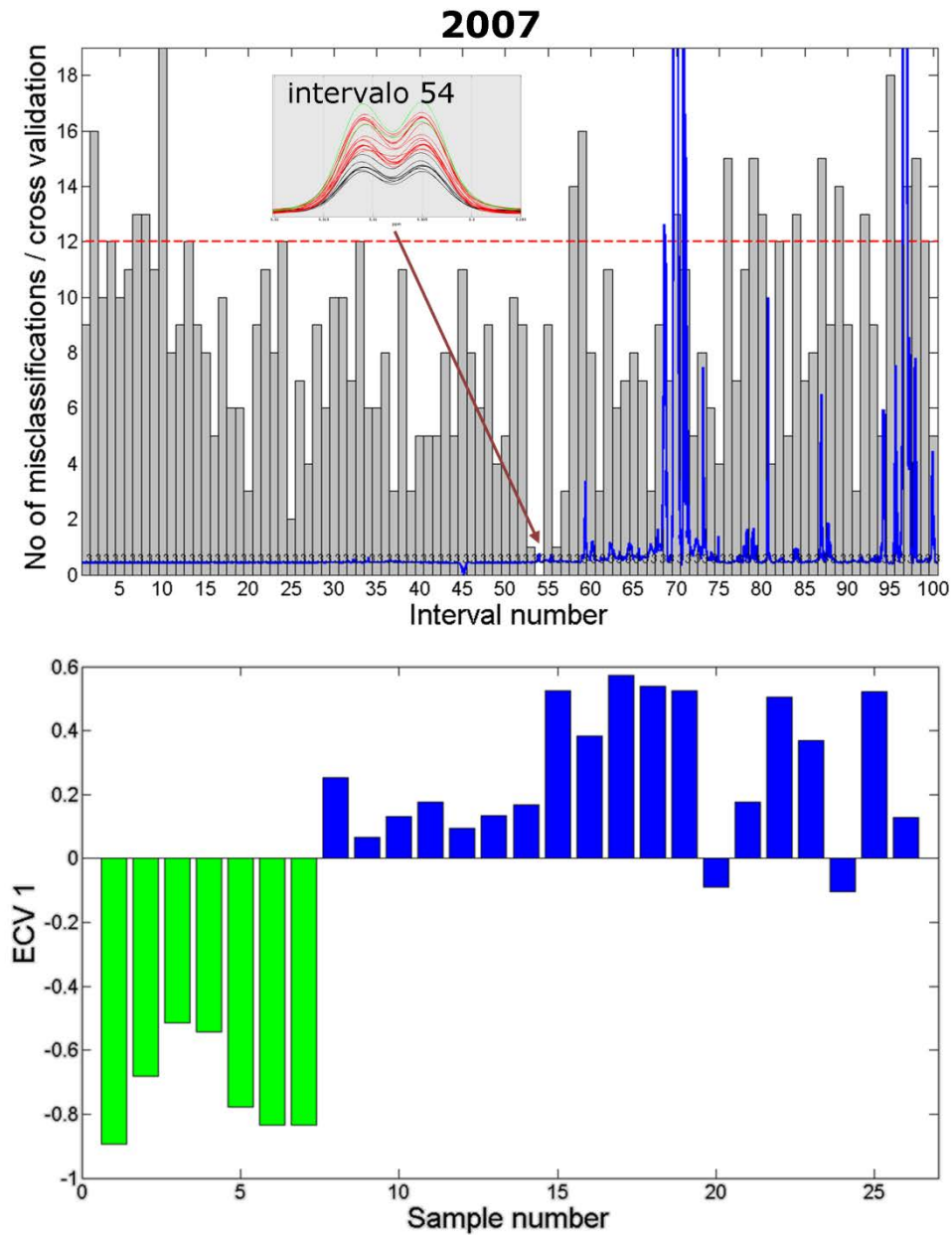
En el año 2007 con 26 muestras, se necesitaron sólo 3 componentes para no cometer ningún error a la hora de clasificar (0% de error). En la Figura 5.10 b se puede ver como todas las muestras de la Rioja Baja están agrupadas y con valores bastante intensos (marcada diferencia con el resto de las muestras). En cambio, en el caso de las muestras de la Rioja Alta y Alavesa, al igual que ocurre con las muestras del año 2006, dos de ellas se encuentran agrupadas con las muestras de la Rioja Baja, aunque con valores muy bajos (poca diferencia entre ambos tipos de muestras).

En el último año con 26 muestras, se emplearon 2 componentes para obtener un número de clasificaciones con error de 3 (11.5% de error). En la Figura 5.11 b se puede ver como ocurre lo mismo que en los años anteriores: la Rioja Baja se encuentra perfectamente agrupada. La Rioja Alta y Alavesa tienen tres muestras que son más parecidas a las de la Rioja Alavesa y con más intensidad que en años anteriores.

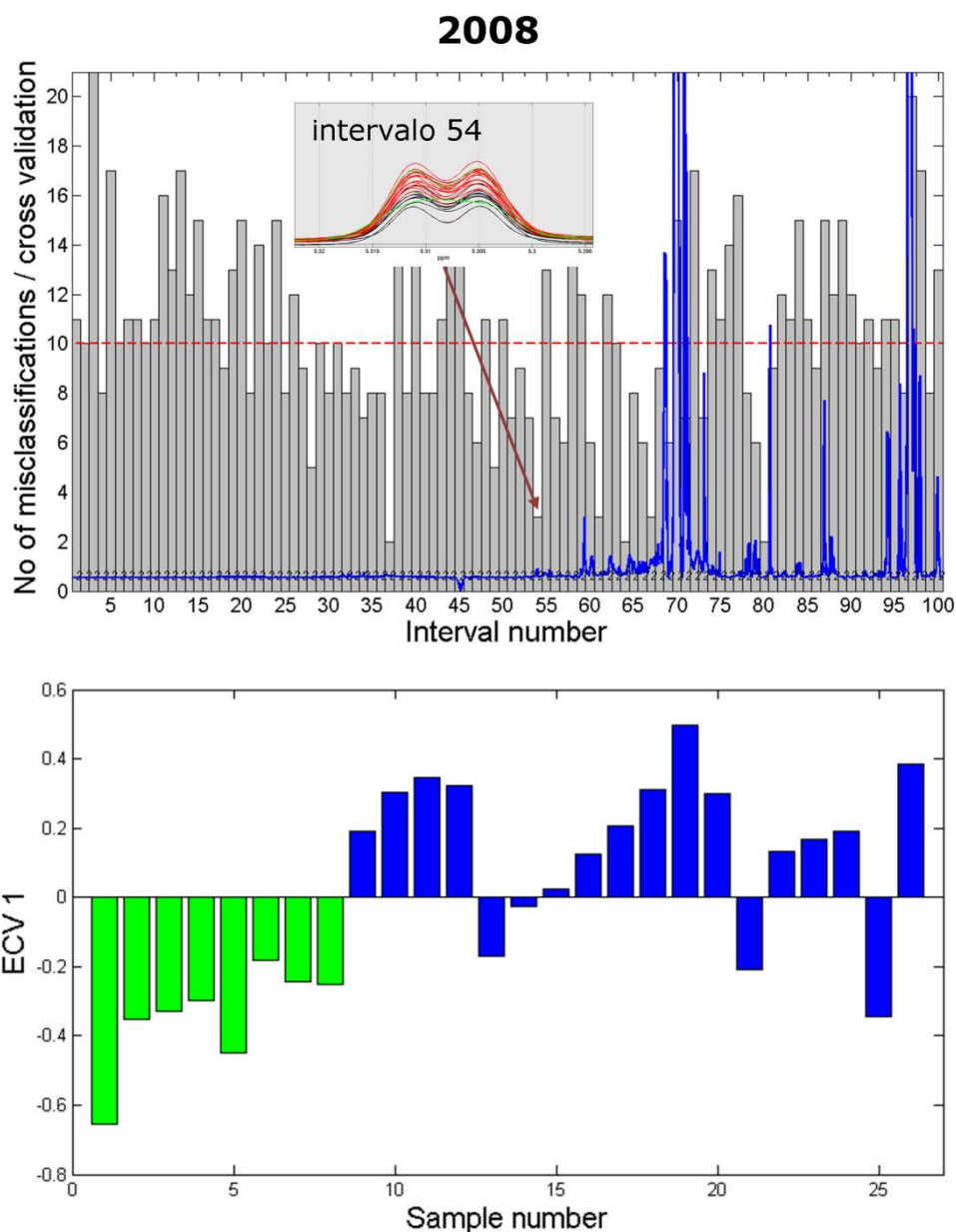
En resumen, utilizando la señal extraída del intervalo 54 se ha podido agrupar perfectamente las muestras en función de la zona de producción a excepción de unas pocas muestras de la Rioja Alta y Alavesa.



**Figura 5.9.** a) Gráfico de iECVA para clasificar en función de las sub-zonas de Rioja, basado en las muestras del año 2006. b) Gráfico de una dimensión del ECVA extraído del intervalo 54 (5.35-5.25 ppm) de las muestras del 2006. Rioja Alta y Alavesa se representan en azul y la Rioja Baja en verde.



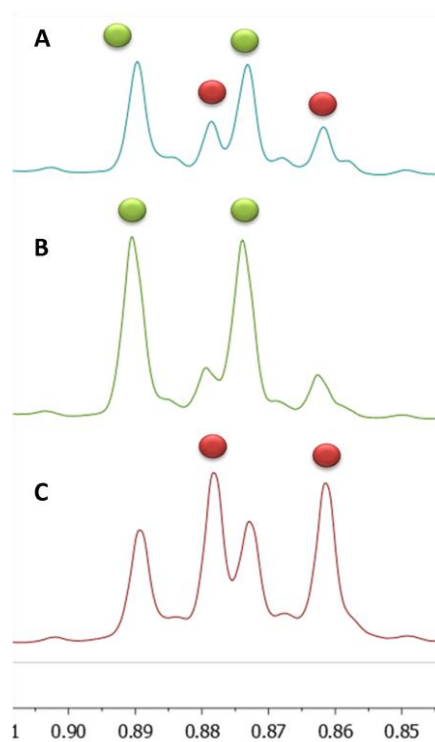
**Figura 5.10.** a) Gráfico de iECVA para clasificar en función de las sub-zonas de Rioja, basado en las muestras del año 2007. b) Gráfico de una dimensión del ECVA extraído del intervalo 54 (5.35-5.25 ppm) de las muestras del 2007. Rioja Alta y Alavesa se representan en azul y la Rioja Baja en verde.



**Figura 5.11.** a) Gráfico de iECVA para clasificar en función de las sub-zonas de Rioja, basado en las muestras del año 2008. b) Gráfico de una dimensión del ECVA extraído del intervalo 54 (5.35-5.25 ppm) de las muestras del 2008. Rioja Alta y Alavesa se representan en azul y la Rioja Baja en verde.

- **Discriminación entre bodegas de la D.O.Ca. Rioja**

Del mismo modo que en el apartado anterior, también se empleó el iECVA para intentar encontrar señales relevantes a la hora de diferenciar entre bodegas. En este caso destacó en los gráficos del iECVA un intervalo común para las tres cosechas que mejoraba la clasificación respecto al modelo global: el intervalo 100 (0.83-0.93 ppm). Dicho intervalo incluye dos señales correspondientes al isobutanol (0.87 ppm, d,  $^3J=6.71$  Hz) y al isopentanol (0.88 ppm, d,  $^3J=6.76$  Hz). Estas señales fueron confirmadas por la adición de compuestos puros a muestras de vino y su correspondiente adquisición del espectro de RMN de protón.



**Figura 5.12.** Espectros de RMN de protón de una muestra de vino (A) en la región del intervalo 100 (0.83-0.93 ppm), el mismo vino con isopentanol puro añadido (B) y con isobutanol (C). En el espectro A se señalan con un círculo verde las señales del isopentanol en el vino, y con un círculo granate las del isobutanol.

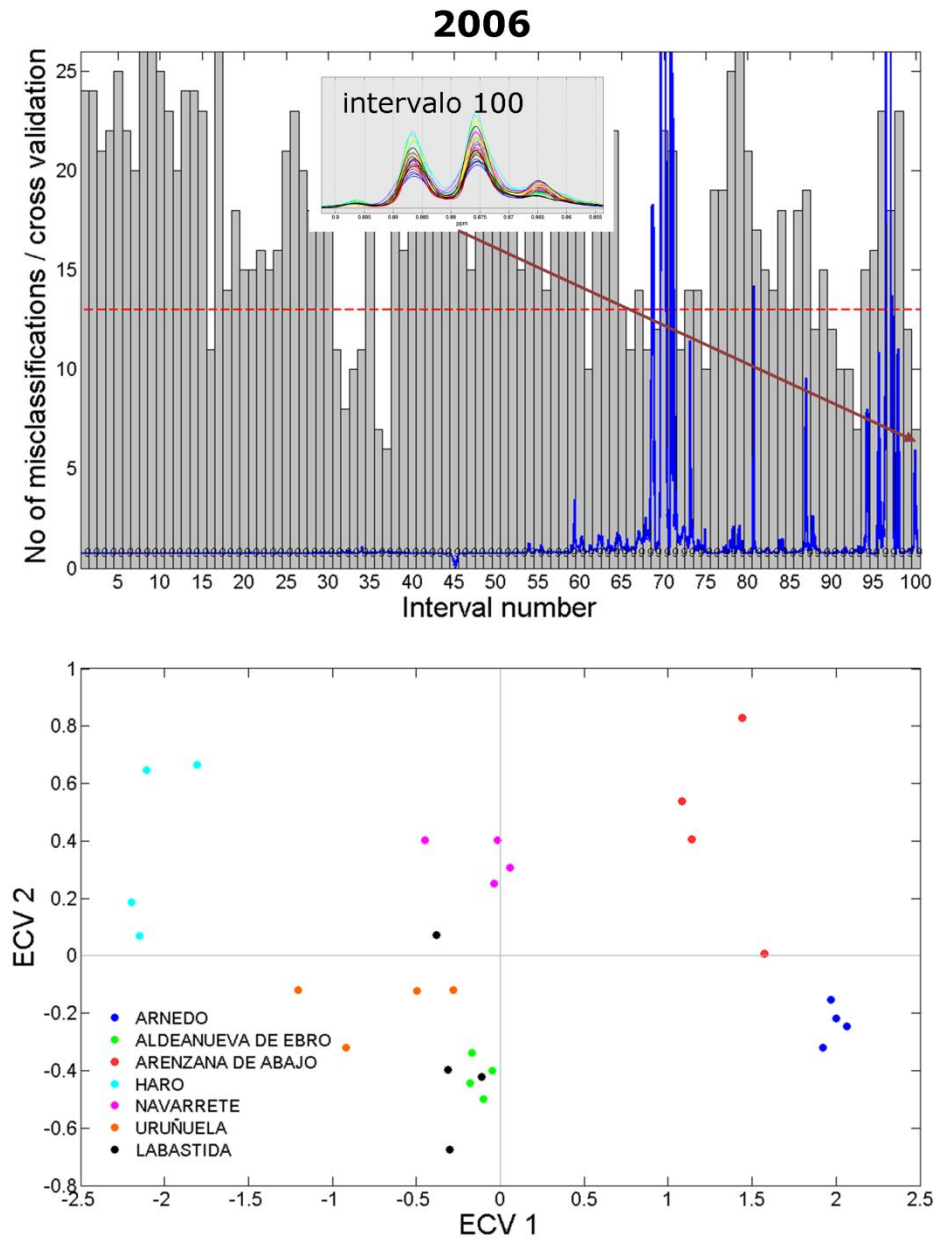
En las figuras siguientes, se muestran los gráficos tanto del iECVA como del ECVA correspondientes a las cosechas 2006 (Figura 5.13), 2007 (Figura 5.14) y 2008 (Figura 5.15).

Con los datos del 2006, tomando 28 muestras necesitaron 9 componentes para reducir el número de clasificaciones con error del modelo global de 13 a 7 (25.00% de error). En la Figura 5.13 b se puede ver como empleando la señal del intervalo 100 se ha podido separar y agrupar todas las muestras por bodegas a excepción de una, las muestras provenientes de Labastida que aparecen solapadas con las de Aldeanueva de Ebro.

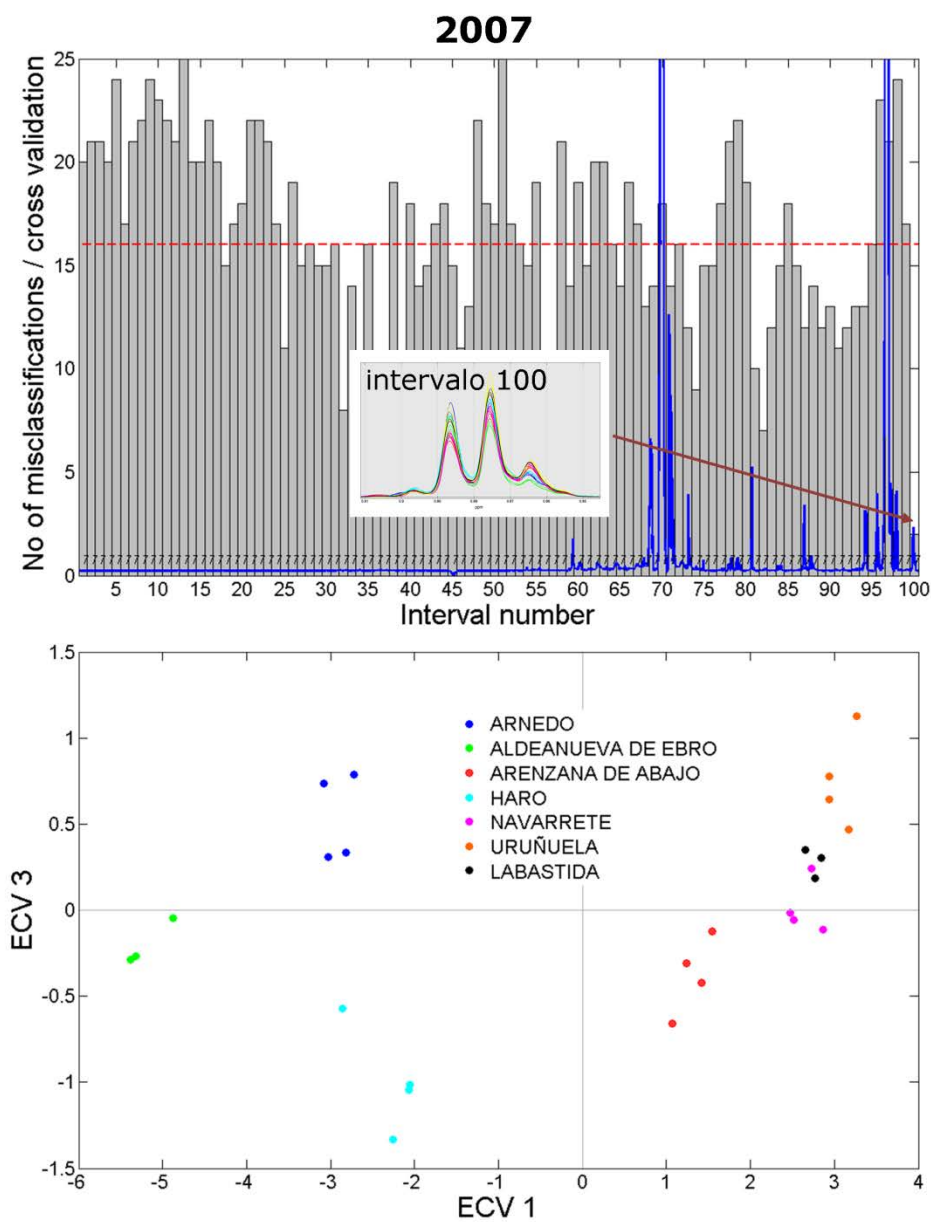
En el año 2007 con 26 muestras, necesitaron 7 componentes para obtener un número de clasificaciones con error de 2 (7.69% de error) frente al modelo global con 16. En la Figura 5.14 b se puede ver como al igual que en el año 2006, con las muestras del 2007 también se han podido agrupar en función de su bodega utilizando sólo el intervalo 100. En este caso las muestras de Labastida aparecen solapadas con las de Navarrete.

En el último año y con 26 muestras, necesitaron 9 componentes para obtener un número de clasificaciones con error de 5 (11.5% de error), frente al modelo global con 19. En la Figura 5.15 b se puede ver como las muestras son agrupadas según la bodega a excepción de las muestras de Aldeanueva de Ebro y Arnedo. En este caso estas dos localidades están muy próximas y pertenecen a la misma subzona, la Rioja Baja.

Con estos resultados, se puede decir que con un pequeño intervalo es posible diferenciar vinos procedentes de bodegas situadas muy próximas geográficamente. El isopentanol y el isobutanol pueden ser considerados como biomarcadores para diferenciar bodegas, individualmente, dentro de la región de La Rioja.

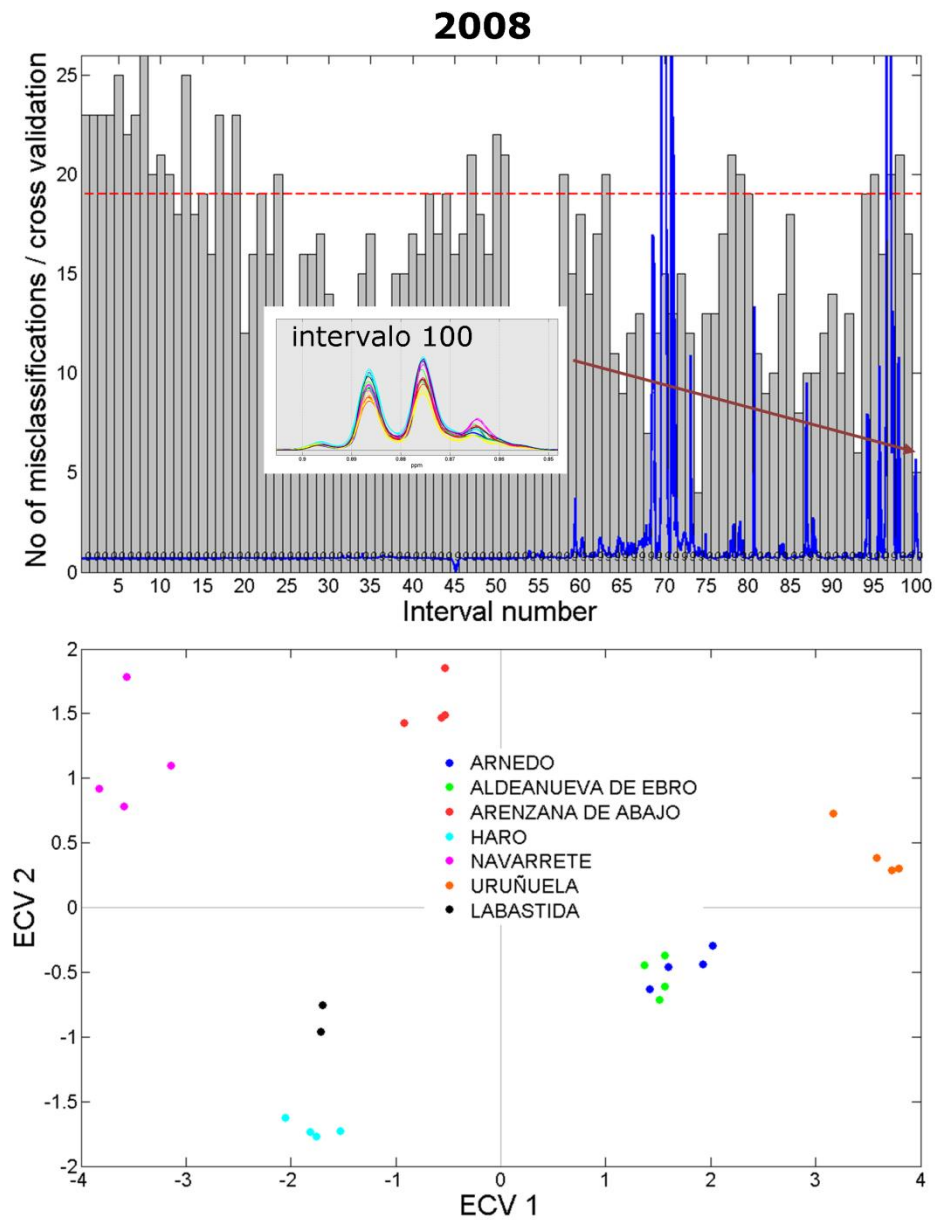


**Figura 5.13.** a) Gráfico de iECVA para clasificar en función de bodegas, basado en las muestras del año 2006. b) Gráfico de dos dimensiones del ECVA extraído del intervalo 100 (0.83-0.93 ppm) de las muestras del 2006.



**Figura 5.14.** a) Gráfico de iECVA para clasificar en función de bodegas, basado en las muestras del año 2007. b) Gráfico de dos dimensiones del ECVA extraído del intervalo 100 (0.83-0.93 ppm) de las muestras del 2007.





**Figura 5.15.** a) Gráfico de iECVA para clasificar en función de bodegas, basado en las muestras del año 2008. b) Gráfico de dos dimensiones del ECVA extraído del intervalo 100 (0.83-0.93 ppm) de las muestras del 2008.

En conclusión, se ha demostrado que el proceso de elaboración del vino en La Rioja puede ser eficientemente explorado por medio de los espectros de RMN de protón de vinos y mostos. El estudio muestra que los mostos y los vinos se diferencian a lo largo de los procesos de fermentación, sub-áreas y, en cierta medida, también en las diferentes añadas.

Por otra parte, por medio del ECVA sobre los espectros de protón, se encontró, incluso a nivel de bodega individual, una discriminación muy buena. Este último hallazgo es notable ya que las bodegas se encuentran en estrecha proximidad geográfica y debido también a que sólo se utiliza una pequeña región del espectro de RMN. Dicha región se asigna a las señales del isopentanol y del isobutanol, en las cuales se encontró que contenían la información suficiente para discriminar entre las bodegas, revelando que estas sustancias son biomarcadores importantes para el *terroir* de La Rioja.

## Capítulo 6

### Seguimiento metabólico de aminoácidos en el proceso de elaboración del vino empleando la RMN de carbono-13

#### 6.1. Introducción y antecedentes

#### 6.2. Seguimiento metabólico de los aminoácidos leucina, isoleucina y fenilalanina durante la fermentación alcohólica de un vino

*6.2.1. Fermentación alcohólica. Transformación de los aminoácidos leucina, isoleucina y fenilalanina en sus alcoholes superiores*

#### 6.3. Seguimiento metabólico del aminoácido Histidina durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica de un vino

*6.3.1. Fermentación alcohólica. Transformación del aminoácido histidina en su alcohol superior*

*6.3.2. Fermentación maloláctica. Transformación del aminoácido histidina en sus aminas*



## 6.1. Introducción y antecedentes

En diversos trabajos se ha demostrado el enorme potencial de la resonancia magnética nuclear de protón en el seguimiento de fermentaciones comerciales,<sup>1</sup> así como a la hora de cuantificar numerosos compuestos presentes en el vino.<sup>2,3,4</sup> En los capítulos anteriores se han presentado los buenos resultados obtenidos a la hora de emplear dicha técnica en el seguimiento y control de varios procesos biológicos, como son las fermentaciones alcohólica y maloláctica,<sup>5,6</sup> en el proceso de crianza en barrica y en la clasificación de muestras combinando la RMN de protón con métodos quimiométricos.

Este capítulo se centrará en el estudio metabólico de compuestos minoritarios en el vino mediante los espectros de RMN de carbono-13. En el vino son muchos los compuestos minoritarios que están presentes y que proporcionan cualidades positivas y negativas al vino. Existen numerosos estudios acerca de los procesos principales que tienen lugar a lo largo de la vinificación del vino y no tantos de los que estudian los procesos secundarios. Es necesario conocer el mecanismo de formación de estos metabolitos para poder decidir sobre la composición del vino que se va a elaborar. En este ámbito, las técnicas analíticas comúnmente utilizadas (HPLC, CG) nos dan una idea global de la evolución de los compuestos, pero no de su origen, del momento de su transformación ni del rendimiento real de esta transformación.

---

<sup>1</sup> Clark, S.; Barnett, N. W.; Adams, M.; Cook, I. B.; Dyson, G. A.; Johnston, G. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 338–345.

<sup>2</sup> Buzas, M. C.; Chira, N.; Deleanu, C.; Rosca, S. *Rev. Chim.* **2003**, *54*, 831–833.

<sup>3</sup> Larsen, F. H.; van den Berg, F.; Engelsens, S. B. *J. Chemom.* **2006**, *20*, 198–208.

<sup>4</sup> Viggiani, L.; Morelli, M. A. C. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8273–8279.

<sup>5</sup> Avenozza, A.; Busto, J. H.; Canal, N.; Peregrina, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4715–4720.

<sup>6</sup> López-Rituerto, E.; Cabredo, S.; López, M.; Avenozza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2112–2118.

Los compuestos minoritarios son prácticamente indetectables mediante RMN de carbono-13 al existir este isótopo en sólo un 1.1%. Sin embargo, al añadir compuestos marcados con cerca del 100% de carbono-13, podemos observar de forma individual su evolución a lo largo de los distintos procesos fermentativos.

Entre los metabolitos minoritarios, los aminoácidos tienen un papel muy importante durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Como se ha explicado más ampliamente en la introducción, los aminoácidos junto con el resto de la materia nitrogenada presente, tanto en el mosto como en el vino, sirven de alimento para las levaduras y las bacterias con el fin de multiplicarse a la hora de comenzar un proceso fermentativo.

La asimilación de los aminoácidos por parte de las levaduras y las bacterias lleva consigo la producción y secreción al medio de compuestos de bajo peso molecular pero de gran impacto en la calidad de los vinos.<sup>7</sup>

Entre estos compuestos, los alcoholes superiores (alcoholes que contienen más de dos átomos de carbono) junto con sus ésteres juegan un papel crucial en el aroma del vino.<sup>8,9</sup> Estos alcoholes superiores son generados principalmente por las levaduras durante el proceso fermentativo a partir de los aminoácidos a través del mecanismo de Ehrlich (Figura 6.1).<sup>10,11</sup>

---

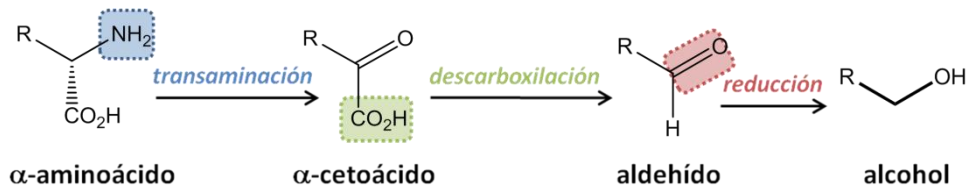
<sup>7</sup> Polášcova, P.; Herszage, J.; Ebeler, S. E. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2478–2489.

<sup>8</sup> Šehovič, D.; Petravič Tominac, V.; Marič, V. *Period. Biol.* **2007**, *109*, 205–217.

<sup>9</sup> Muñoz, D.; Peinado, R. A.; Medina, M.; Moreno, J. *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *222*, 629–635.

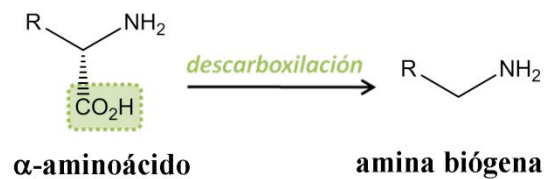
<sup>10</sup> Bell, S.-J.; Henschke, P.A. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242–295.

<sup>11</sup> Hazelwood, L. A.; Daran, J.-M.; van Maris, A. J. A.; Pronk, J. T.; Dickinson, J. D. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2259–2266.



**Figura 6.1.** Mecanismo de asimilación de nitrógeno de Ehrlich.

Por el contrario, los compuestos que generan las bacterias lácticas a partir de la asimilación de ciertos aminoácidos son las aminas biógenas. Estas aminas, como se ha explicado en el capítulo de la introducción, tienen una repercusión negativa en la calidad de los vinos ya que pueden afectar a la salud del consumidor, produciendo dolor de cabeza, dificultades respiratorias, palpitaciones cardiacas, hiper- o hipotensión y desordenes alérgicos.<sup>12</sup> Su formación procede de un proceso de descarboxilación enzimática de los aminoácidos, como se muestra en la Figura 6.2.



**Figura 6.2.** Mecanismo de formación de las aminas biógenas.

Las aminas biógenas están presentes en multitud de alimentos y su concentración varía entre 10-30 mg/Kg (chocolate, bebidas alcohólicas) a 200-1500 mg/Kg (salchichas y quesos). Su producción, normalmente, está ligada a una

<sup>12</sup> Landete, J.M.; Pardo, I.; Ferrer, S. *FEMS Microbiol. Lett.* **2006**, *260*, 84–90.

falta de higiene. Por ello, el contenido en aminas biógenas es un indicador del nivel de desarrollo en las prácticas de producción.<sup>13</sup>

Un conocimiento íntegro del mecanismo y el momento de formación de estos metabolitos minoritarios puede ayudar a controlar su concentración; aumentarla en el caso de los alcoholes superiores y disminuirla en el caso de las aminas biógenas.

Así, la metodología empleada a lo largo de este capítulo consiste en la adición de una cantidad conocida de un aminoácido marcado isotópicamente con carbono-13 a un mosto o un vino con el que se realizará las fermentaciones alcohólica y/o maloláctica. El seguimiento de estos procesos se realizará con la adquisición de espectros de carbono-13 y de protón.

---

<sup>13</sup> Mazzoli, R.; Lamberti, C.; Coisson, J. D.; Purrotti, M.; Arlorio, M.; Giuffrida, M. G.; Giunta, C.; Pessione, E. *Amino Acids* **2009**, *36*, 81–89.



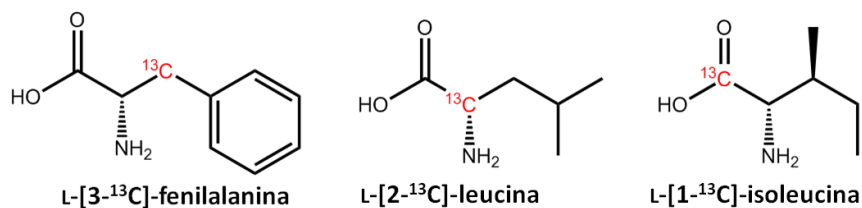
## 6.2. Seguimiento metabólico de los aminoácidos leucina, isoleucina y fenilalanina durante la fermentación alcohólica de un vino

### 6.2.1. Fermentación alcohólica. Transformación de los aminoácidos leucina, isoleucina y fenilalanina en sus alcoholes superiores

La uva utilizada fue tinta de la variedad Garnacha (*Vitis vinifera*) y fue vendimiada manualmente en una viña de Tudelilla, La Rioja. La composición del mosto fue la siguiente: azúcar (densidad) 1.102 g/mL; acidez total, 3.33 g/L ( $H_2SO_4$ ); pH, 3.24; ácido málico, 1.45 g/L; antocianos totales, 93.3 mg/L. La uva, una vez despalillada y estrujada, fue homogeneizada.

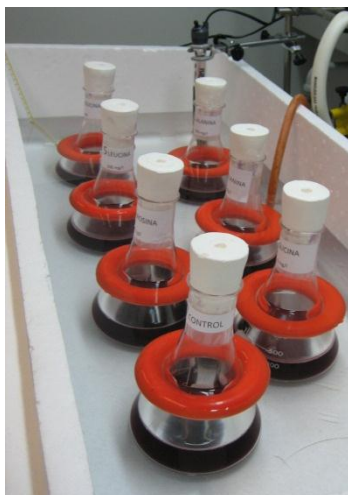
Los aminoácidos seleccionados para el estudio fueron la L-fenilalanina, la L-leucina y L-isoleucina, que se transforman en 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico) y (*S*)-2-metil-1-butanol (alcohol amílico), respectivamente. La fermentación alcohólica se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer introducidos en un baño termostatzado a 25 °C y cada mosto fue activado con levaduras Uvaferm BC, a razón de 30g/hL, tal y como especifica el fabricante. Se hizo el seguimiento de la fermentación alcohólica mediante RMN de protón usando el método de cuantificación descrito en el Capítulo 4.

Para seguir la transformación de los aminoácidos durante la fermentación alcohólica, se añadieron 50 mg de aminoácido marcado isotópicamente con carbono-13 en 500 mL de mosto con el fin de obtener una concentración final de 100 mg/L de L-[3- $^{13}C$ ]-fenilalanina (99% carbono-13, muestra A), L-[2- $^{13}C$ ]-leucina (99% carbono-13, muestra B), y L-[1- $^{13}C$ ]-isoleucina (99% carbono-13, muestra C), respectivamente (Figura 6.3). Las concentraciones empleadas se encuentran dentro del rango habitual de cada aminoácido en el mosto.<sup>10</sup>



**Figura 6.3.** Aminoácidos estudiados.

En todos los casos, las microfermentaciones fueron llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer usando 500 mL de mosto con su correspondiente aminoácido marcado (muestras A, B y C) y otro sin aminoácido marcado (muestra D). La fermentación alcohólica transcurrió bajo condiciones normales de temperatura (25 °C) y se recogieron 4 mL de muestra en diferentes intervalos (0, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 96, 120 y 144 horas). La fermentación alcohólica fue seguida mediante RMN de protón, y la señal del etanol (1,17 ppm) fue observada por primera vez a las 32 horas en todas las muestras, a la vez que se observaba actividad en las muestras (Figura 6.4 y Figura 6.5).



**Figura 6.4.** Fotografía del baño utilizado para controlar la temperatura durante las fermentaciones.



**Figura 6.5.** a) Fotografía de la fermentación en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. b) Microvinificación en pleno proceso de fermentación.

Los tres aminoácidos marcados que se seleccionaron para este estudio estaban disponibles comercialmente y sus correspondientes alcoholes poseen influencia en el perfil aromático del vino. La L-fenilalanina es un aminoácido importante en el mosto como fuente de materia nitrogenada para las levaduras. El rango de concentraciones en vino, como muestra la literatura, es 2,8-138 mg/L<sup>10</sup> y forma parte de la biosíntesis de importantes metabolitos como los flavanoides y compuestos relacionados. Este aminoácido también está involucrado en el proceso biosintético de resveratrol a través de la vía del fenilpropanoide.<sup>14,15</sup> Debido al interés de este compuesto, algunos grupos de investigación han desarrollado nuevas cepas de levaduras con la habilidad de producir resveratrol a través de la fenilalanina.<sup>16</sup> Además, la L-fenilalanina es el principal precursor del 2-feniletanol, responsable del aroma a rosa en el vino (Figura 6.6).<sup>17,18</sup>

---

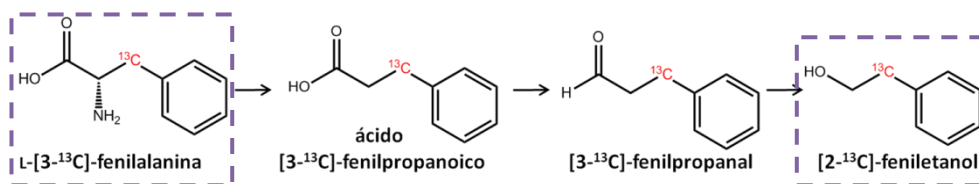
<sup>14</sup> Halls, C.; Yu, O. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 77–81.

<sup>15</sup> Zhang, Y.; Li, S.-Z.; Li, J.; Pan, X.; Cahoon, R. E.; Jaworski, J. G.; Wang, X.; Jez, J. M.; Chen, F.; Yu, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13030–13031.

<sup>16</sup> Becker, J. V. W.; Armstrong, G. O.; van der Merwe, M. J.; Lambrechts, M. G.; Vivier, M. A.; Pretorius, I. S. *FEMS Yeast Res.* **2003**, *4*, 79–85.

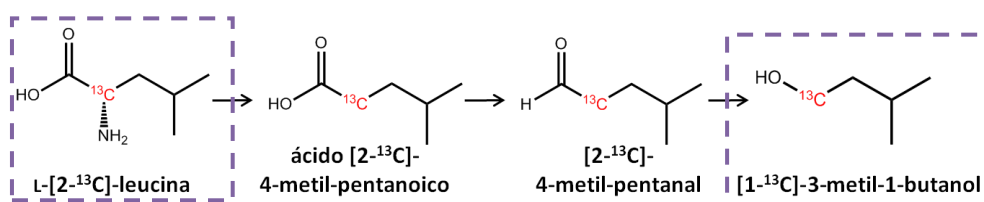
<sup>17</sup> Genovese, A.; Piombino, P.; Gambuti, A.; Moio, L. *Food Chem.* **2009**, *114*, 100–107.

<sup>18</sup> Etschmann, M. M. W.; Bluemke, W.; Sell, D.; Schrader, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 1–8.



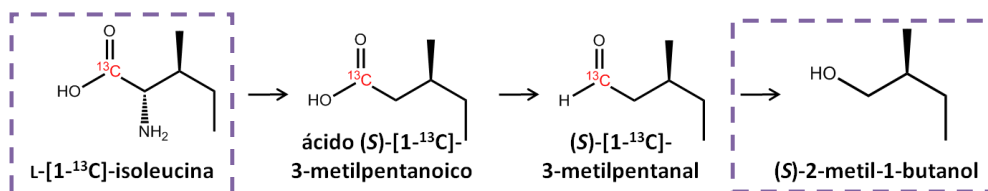
**Figura 6.6.** Ruta de transformación de la L-[3-<sup>13</sup>C]-fenilalanina en [2-<sup>13</sup>C]-feniletanol.

Por otro lado, la L-leucina es un aminoácido esencial para los humanos y su rango de concentración en el vino es de 2-160 mg/L.<sup>10</sup> La L-leucina es transformada siguiendo el mecanismo de Ehrlich en alcohol isoamílico, que aporta aroma a whisky, queso y olores herbáceos (Figura 6.7).



**Figura 6.7.** Ruta de transformación de la L-[2-<sup>13</sup>C]-leucina en [1-<sup>13</sup>C]-3-metil-1-butanol.

La L-isoleucina también es un aminoácido esencial para los humanos y su rango de concentraciones en el vino según la bibliografía es de 1-117 mg/L.<sup>10</sup> La L-isoleucina es transformada, siguiendo el mecanismo de Ehrlich, en alcohol amílico que aporta aromas a alcohol (Figura 6.8).<sup>17</sup>

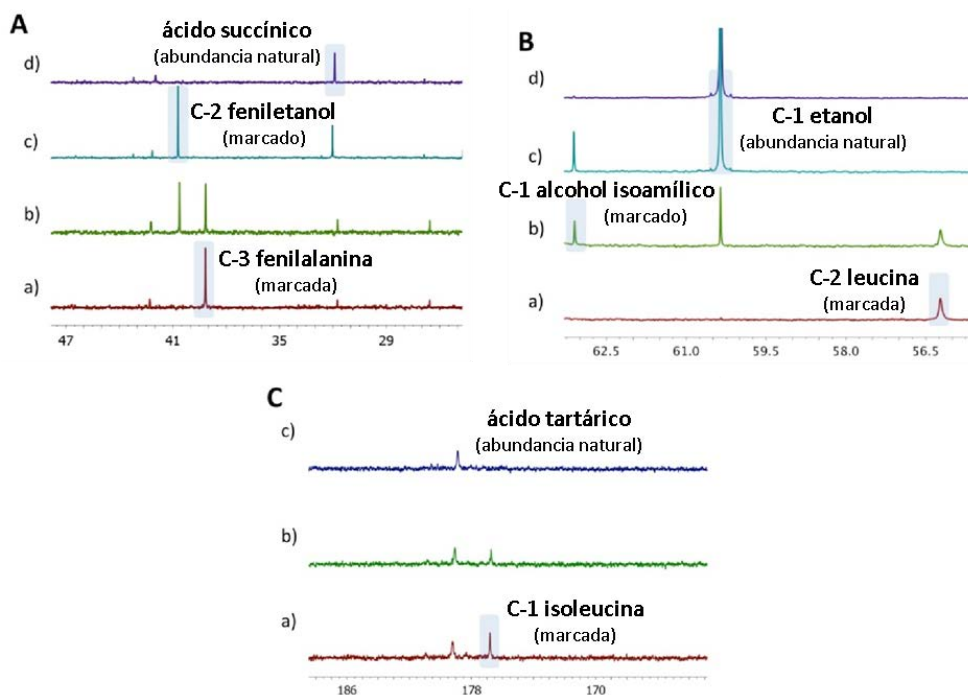


**Figura 6.8.** Ruta de transformación de la L-[1-<sup>13</sup>C]-isoleucina en (S)-2-metil-1-butanol.

Antes de comenzar el estudio de la evolución de los aminoácidos marcados en la fermentación alcohólica, se realizaron experimentos de RMN de carbono-13 para identificar los desplazamientos químicos de los compuestos marcados isotópicamente con carbono-13. De este modo, se identificó la señal de la L-[3-<sup>13</sup>C]-fenilalanina a 39,2 ppm, la L-[2-<sup>13</sup>C]-leucina a 56,2 ppm y por último la L-[1-<sup>13</sup>C]-isoleucina a 176,8 ppm.

Los espectros de RMN de carbono-13 iniciales del mosto muestran señales que corresponden a compuestos mayoritarios como son los azúcares y los ácidos orgánicos en abundancia natural de carbono-13 (1.1%) de dichos compuestos. También, junto a estos aparecen las señales que corresponden al carbono marcado con carbono-13 en cada aminoácido. En la Figura 6.9 aparece en la **A**) la L-[3-<sup>13</sup>C]-fenilalanina, en la **B**) la L-[2-<sup>13</sup>C]-leucina y en la **C**) la L-[1-<sup>13</sup>C]-isoleucina.

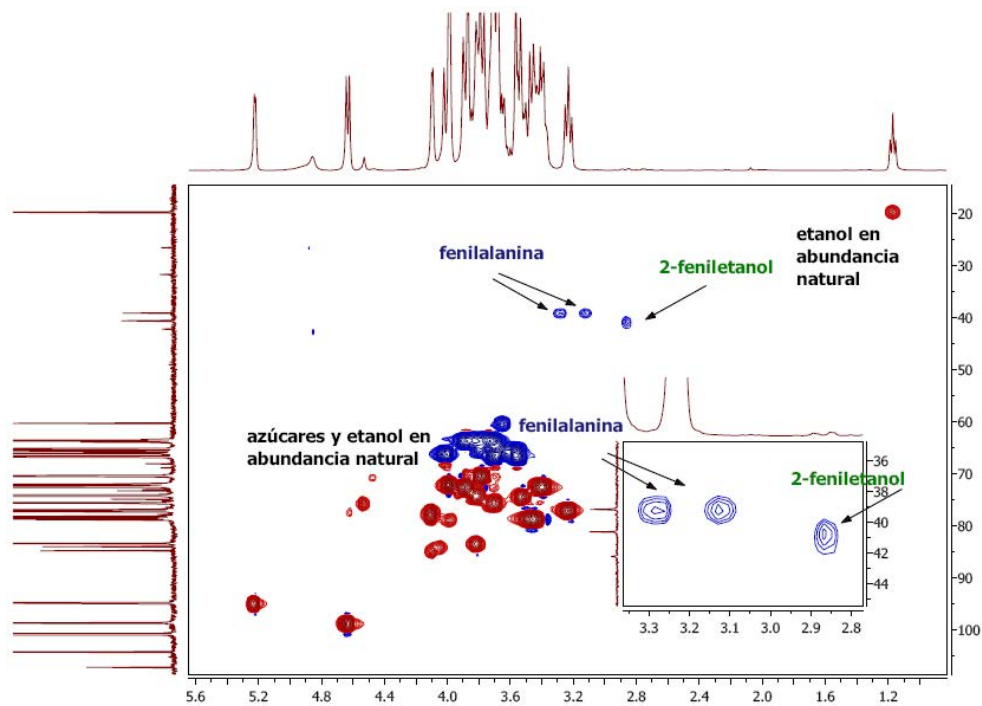
Como cabía esperar, las señales de los aminoácidos van desapareciendo a medida que la fermentación alcohólica comienza, hasta que pasadas 32 horas ya no se observa señal de los aminoácidos marcados. En las muestras **A** y **B**, estas señales desaparecen rápidamente: a las 24 horas ya no se observan señales de la L-[3-<sup>13</sup>C]-fenilalanina ni de la L-[2-<sup>13</sup>C]-leucina, aunque se pueden observar las señales del etanol y los ácidos acético, succínico y málico con su abundancia natural. En cambio en la muestra **C**, la desaparición de esta señal es algo más lenta y hasta las 32 horas se observa la señal de la L-[1-<sup>13</sup>C]-isoleucina.



**Figura 6.9.** Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  del seguimiento de la transformación de los aminoácidos en alcoholes superiores. A) L-[3- $^{13}\text{C}$ ]-fenilalanina, muestra A a: a) 0h, b) 48h y c) 144h y d) muestra control a 144h. B) L-[2- $^{13}\text{C}$ ]-leucina, muestra B a: a) 0h, b) 48h y c) 144h y d) muestra control a 144h. C) L-[1- $^{13}\text{C}$ ]-isoleucina, muestra C a: a) 0h, b) 32h y c) 72h. La escala vertical es la misma para todos los espectros.

A las 48 horas, en las muestras **A** y **B** se pueden observar dos señales nuevas que no se detectan en la muestra control en ese momento (Figura 6.9). Estas señales aparecen a 40,6 ppm para la muestra **A** y a 63,1 ppm para la muestra **B**. Dichas señales fueron asignadas como el C-2 del feniletanol para la muestra **A** y el C-1 del alcohol isoamílico de la muestra **B**. Para corroborar este hecho, se obtuvieron los espectros de RMN de carbono-13 de patrones comerciales del feniletanol y del alcohol isoamílico. Del mismo modo, se comprobó que la señal correspondiente al alcohol amílico no se encontraba presente en la muestra **C**.

Tampoco se pudo detectar en ningún caso señales correspondientes a los metabolitos intermedios de la transformación de Erhlich.



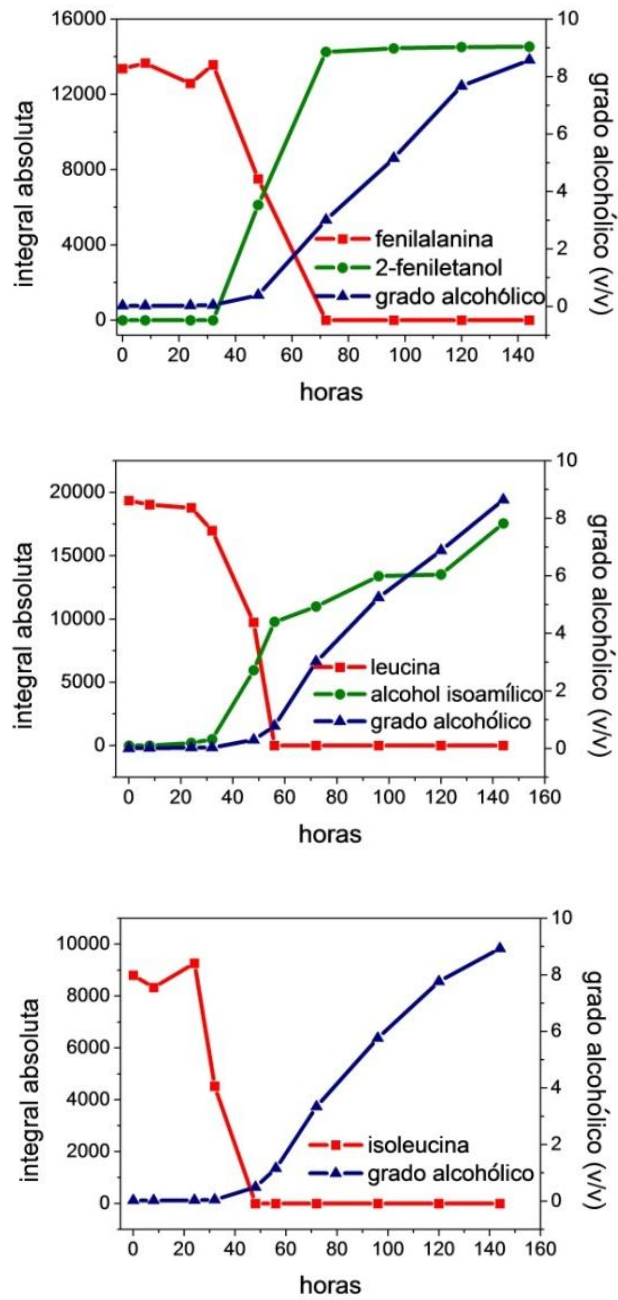
**Figura 6.10.** Experimento HSQC editado donde se observan los acoplamientos a un enlace entre los carbonos marcados con sus respectivos protones.

La asignación de las dos señales de carbono de la fenilalanina se realizó a partir de sus desplazamientos químicos. Sin embargo, con el fin de confirmar dicha asignación se realizaron experimentos bidimensionales, en los que se correlaciona el protón en una dimensión con el carbono en una segunda dimensión. Así, al efectuar un experimento HSQC editado, pudimos obtener los desplazamientos de protón para los hidrógenos adyacentes al carbono marcado para ambos compuestos (Figura 6.10). Dicho desplazamiento coincide con los valores descritos en la bibliografía para estos compuestos, hecho que corrobora su asignación.

En las muestras **A** y **B** a las 144 horas se observa como las señales de los aminoácidos L-[3-<sup>13</sup>C]-fenilalanina y L-[2-<sup>13</sup>C]-leucina han desaparecido completamente y en su lugar se observan las señales correspondientes al [2-<sup>13</sup>C]-feniletanol y al [1-<sup>13</sup>C]-3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico marcado con carbono-13 en C-1). En cambio, en la muestra **C** a las 144 horas se observa como la señal de la L-[1-<sup>13</sup>C]-isoleucina ha desaparecido completamente, pero no se observa la aparición de la señal correspondiente a su alcohol superior, el (*S*)-2-metil-1-butanol. Esto es debido a que el carbono marcado isotópicamente es el carbono carboxílico del aminoácido, el cual se elimina como dióxido de carbono durante el mecanismo de transformación de Ehrlich, dando como resultado la imposibilidad de observar la señal correspondiente al alcohol superior de la isoleucina.

Se comparó la evolución del consumo de los aminoácidos con compuestos principales en el vino, como es el etanol (Figura 6.11), y se pudo observar como el consumo de los aminoácidos marcados, fenilalanina, leucina e isoleucina era muy rápido al comienzo de la fermentación alcohólica. Tanto la fenilalanina como la leucina fueron consumidos completamente cuando el grado alcohólico alcanzaba valores del 1% (v/v) y la isoleucina con valores próximos al 3% (v/v).





**Figura 6.11.** Evolución de los aminoácidos, alcoholes superiores (por RMN de carbono-13) y grado alcohólico (por RMN de protón).

Una de las conclusiones que podemos obtener de estos gráficos (Figura 6.11) es que los tres aminoácidos son consumidos en su totalidad en el comienzo de la fermentación alcohólica. Además, simultáneamente al consumo de los aminoácidos marcados L-[3-<sup>13</sup>C]-fenilalanina y L-[2-<sup>13</sup>C]-leucina se observa la aparición de los alcoholes superiores [2-<sup>13</sup>C]-feniletanol y [1-<sup>13</sup>C]-3-metil-1-butanol. En cambio, a lo largo de todo el proceso no se observan metabolitos intermedios del mecanismo de Ehrlich, como son los cetoácidos o los aldehídos derivados de los aminoácidos marcados. Tampoco se encontraron derivados de aminas en ninguno de los espectros, de manera que se puede constatar que la formación de aminas biógenas no tiene lugar a partir de los aminoácidos de la uva durante la fermentación alcohólica, sino que en todo caso se formarán a lo largo de la fermentación maloláctica.

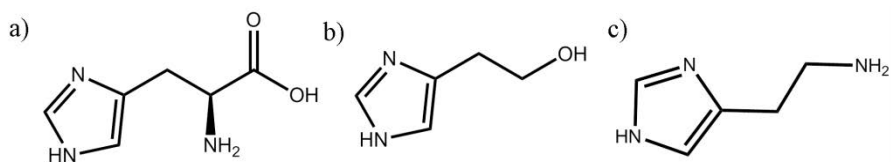
También fue preparada una muestra **E**, sobre la que se llevó a cabo la fermentación alcohólica tras la adición de los tres aminoácidos marcados isotópicamente con <sup>13</sup>C en el mismo matraz. Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores con la única diferencia que la fermentación alcohólica tuvo lugar ligeramente más rápida, debido posiblemente al mayor contenido de materia nitrogenada en el mosto.

### 6.3. Seguimiento metabólico del aminoácido histidina durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica de un vino

La histidina es uno de los 20 aminoácidos que han sido detectados en el vino y que proviene de la uva formando parte de la materia nitrogenada fermentable por las levaduras.

Este aminoácido, como se ha visto con el resto de los aminoácidos, es utilizado en el comienzo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica como sustrato para las levaduras y bacterias lácticas con el fin de poder multiplicarse y alcanzar las poblaciones óptimas de fermentación. La histidina es biotransformada tanto en alcoholes como en aminas por la acción de las levaduras y las bacterias lácticas, respectivamente. De entre sus derivados, la histamina ha sido ampliamente estudiada debido a su alta toxicidad. En cambio, poco se conoce del alcohol derivado, el histaminol.<sup>19</sup>

Las aminas biógenas son generadas principalmente por la descarboxilación de los aminoácidos por parte de determinadas bacterias lácticas. Existen más de 25 aminas biógenas diferentes en el vino y la putrescina es la más abundante. La histamina es conocida por causar dolor de cabeza, disminución en la presión sanguínea, palpitaciones, vómitos y diarreas (Figura 6.12).<sup>20</sup>



**Figura 6.12.** Moléculas de a) histidina, b) histaminol y c) histamina.

<sup>19</sup> Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Arlorio, M.; Coisson J. D. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 10202–10208.

<sup>20</sup> Landete, J.M.; de la Rivas, B.; Marcobal, A.; Muñoz, R. *Ann. Microbiol.* **2011**, 61, 159–166.

La actividad del enzima histidina descarboxilasa (HDC) es la principal responsable de la aparición de histamina en el vino. Las bacterias lácticas en presencia de altas concentraciones de histidina aumentan dicha actividad, provocando una mayor producción de las aminas biógenas.<sup>12</sup> Así, el mejor método para prevenir su aparición es utilizar bacterias lácticas que no posean dicha actividad. Esta característica es una de las que deben cumplir las bacterias lácticas a la hora de ser seleccionadas para los preparados liofilizados.

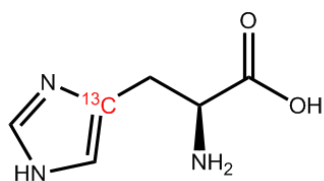
Por ello y debido a las controversias encontradas en cuanto al momento de generación de las aminas biógenas y su origen, esta última parte de la tesis se centró en el seguimiento de la histidina a lo largo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica.

*6.3.1. Fermentación alcohólica: transformación del aminoácido histidina en su alcohol superior*

La uva utilizada fue tinta, de la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera*) perteneciente a Bodegas Patrocinio S.C.L. en Uruñuela, La Rioja. La uva, una vez despalillada y estrujada, fue homogeneizada y se tuvo macerando en frío con unos niveles de sulfuroso libre de 39 mg/L. Se le añadieron enzimas de extracción de color en razón de 750 gramos en 42000 litros. La composición del mosto fue la siguiente: azúcar (densidad) 1.110 g/mL; acidez total, 3.33 g/L (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); pH, 3.35; ácido málico, 3.23 g/L. La uva una vez despalillada y estrujada fue homogeneizada.

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer introducidos en un baño termostatzado a 25°C y cada mosto fue activado con levaduras Uvaferm BC, a razón de 30 g/hL, tal y como especifica el fabricante. Se hizo el seguimiento de la fermentación alcohólica mediante RMN de protón usando el método de cuantificación descrito en el Capítulo 4.

Para seguir la transformación de la histidina durante la fermentación alcohólica, se añadieron 40.9 mg de aminoácido marcado isotópicamente con carbono-13 en 500 mL de mosto con el fin de obtener una concentración final de 81.0 mg/L de L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina (Figura 6.13). Del mismo modo, se añadieron 41.0 mg a otro Erlenmeyer de aminoácido sin marcar isotópicamente con el fin de tener una concentración de 81.2 mg/L. La señal de este aminoácido sin marcar no se detectará en el espectro de carbono-13 pero si en el de protón. La concentración de histidina empleada en los dos casos se encuentra dentro del rango de concentración presente en el mosto.<sup>10</sup>



L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina

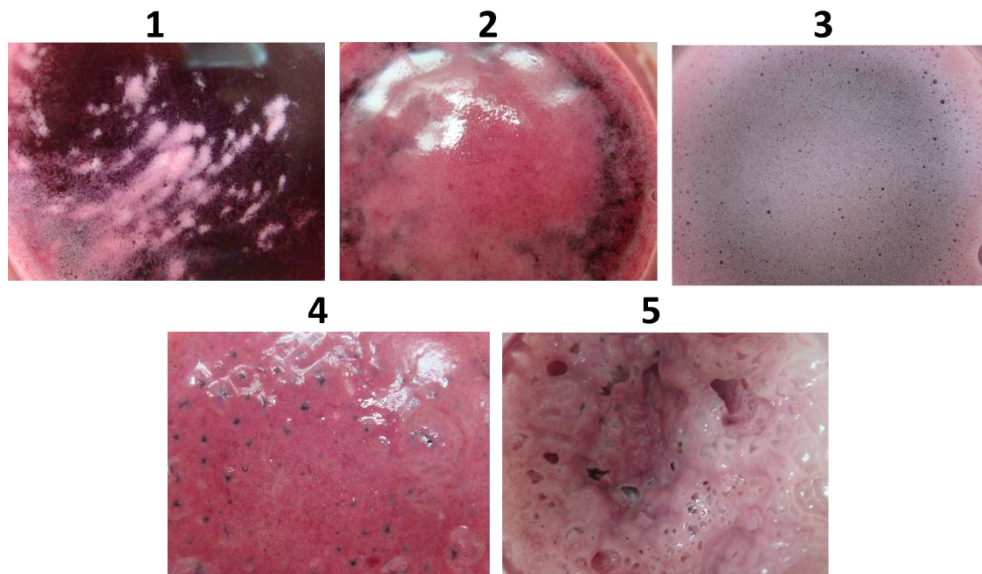
**Figura 6.13.** Histidina utilizada.

En todos los casos, las microfermentaciones fueron llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer usando 500 mL de mosto con la histidina marcada (muestra **A**), otro con histidina sin marcar (muestra **B**) y otro sin añadir aminoácido (muestra **C**). La fermentación alcohólica transcurrió bajo condiciones normales de temperatura (25 °C) y se recogieron 5 mL de muestra en diferentes intervalos (0, 9, 21.5, 26, 30, 34, 46, 50, 54, 58, 71.5, 78, 84.5, 98 y 105.5 horas). La fermentación alcohólica fue seguida mediante RMN de protón, y la señal del etanol (1.17 ppm) fue observada por primera vez a las 30 horas en todas las muestras, a la vez que se observaba actividad en las mismas.

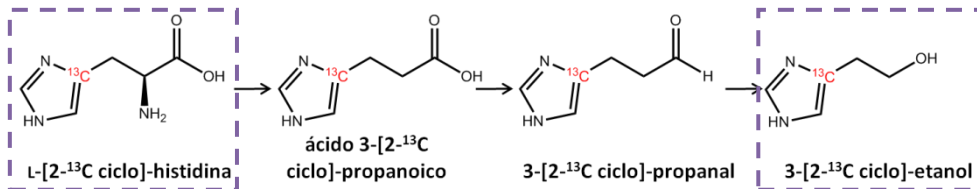
En las imágenes de la Figura 6.14, se puede ver la evolución de la fermentación alcohólica visualmente. La primera coincide con las 30 horas desde el comienzo de la fermentación alcohólica.

La histidina se transforma en el 2-(1*H*-imidazol-4-il)-etanol a través del mecanismo de Ehrlich, pero a diferencia del resto de los alcoholes superiores, de éste se conoce poco sobre sus características organolépticas. Este compuesto fue bautizado como histaminol por Bordiga *et al*, en un trabajo en el cual afirmaban que su biosíntesis provenía de la oxidación de la histamina al histaminol por la

acción de varias myco-bacterias y algunas levaduras como la *Sach. rouxii*.<sup>21</sup> En nuestro trabajo partimos de la hipótesis de que sólo a partir de la histidina y no de la histamina se genera el histaminol a través del mecanismo de Ehrlich (Figura 6.15).



**Figura 6.14.** Evolución de la fermentación alcohólica mediante imágenes tomadas a los matraces Erlenmeyer. Los números ascendentes corresponden con diferentes momentos en el tiempo durante la fermentación alcohólica.

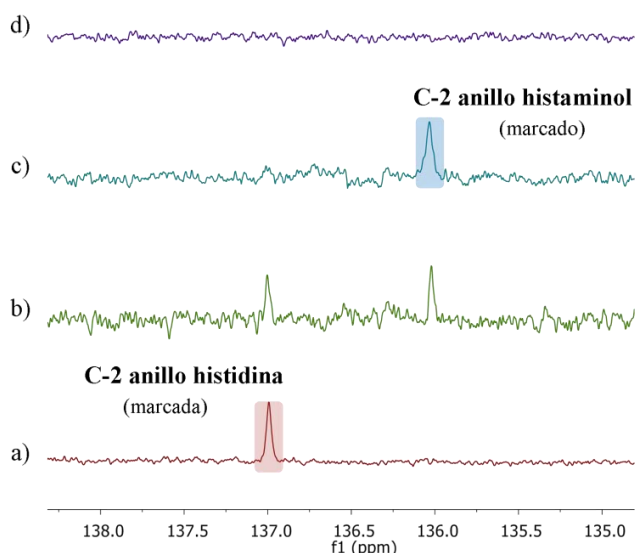


**Figura 6.15.** Ruta de transformación de la L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina en 3-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-etanol.

<sup>21</sup> Bordiga, M.; Travaglia, F.; Locatelli, M.; Arlorio, M.; Coisson, J. D. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 10202–10208.

Antes de comenzar el estudio de la evolución de la histidina en la fermentación alcohólica, se realizaron experimentos de RMN de carbono-13 para identificar el desplazamiento químico de la histidina marcada isotópicamente con carbono-13. De este modo, se identificó la señal de la L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina a 137.0 ppm. Para corroborar este hecho, se obtuvo el espectro de RMN de carbono-13 del patrón comercial de la histidina.

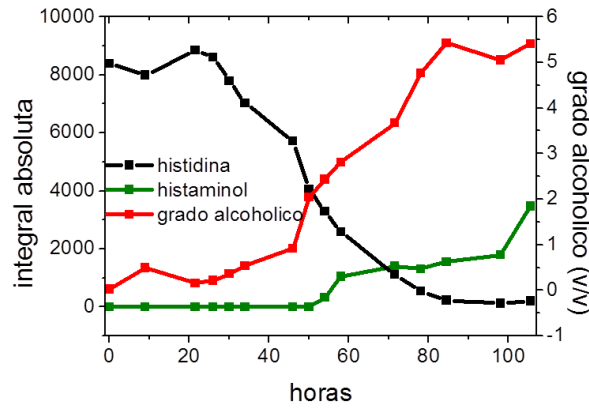
Como cabía esperar, la señal del aminoácido va desapareciendo a medida que la fermentación alcohólica comienza. En este caso, el consumo de la histidina es bastante lento. A las 54 horas se observa por primera vez la señal del histaminol a 136.0 ppm y a las 84.5 horas ya no se observa señal de la histidina marcada. Para confirmar el hecho de que la señal nueva aparecida en el espectro corresponde con la del histaminol se obtuvo el espectro de RMN de carbono-13 de su patrón comercial (Figura 6.16).



**Figura 6.16.** Espectros de RMN de carbono-13 del seguimiento de transformación del aminoácido L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina en su alcohol superior, [2-<sup>13</sup>C ciclo]-histaminol: a) 0h, b) 71.5h y c) 105.5h y d) muestra control sin añadir aminoácido a 105.5h.

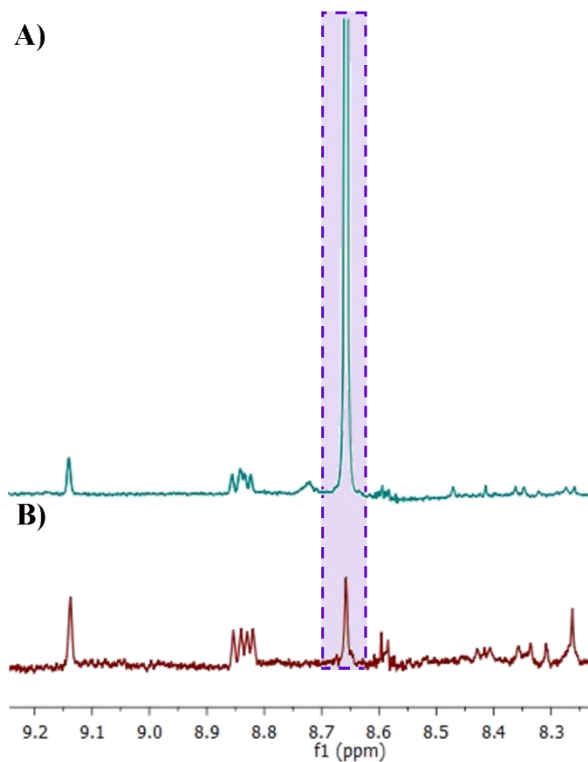


Se comparó la evolución del consumo de la histidina con el de la formación del etanol (Figura 6.17) y se pudo observar como el consumo de la histidina marcada era muy rápido al comienzo de la fermentación alcohólica, pero en este caso su consumo total no se observó hasta que tuvo un grado alcohólico de 5.42 v/v.

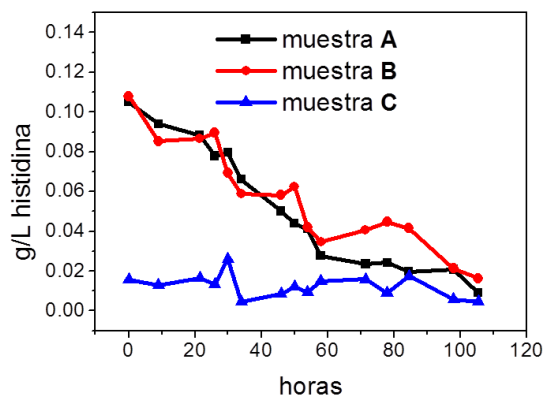


**Figura 6.17.** Evolución de la transformación de la histidina en histaminol seguida por RMN de carbono-13 y expresado en integral absoluta. Evolución del etanol seguido por RMN de protón y expresado en grado alcohólico en v/v.

Con el fin de valorar la evolución de esta transformación se comparó con el consumo de la histidina natural añadida en la muestra **B**, mediante su cuantificación con la metodología puesta a punto en el capítulo 4 por RMN de protón (Figura 6.18). En la Figura 6.19 se observa como la cinética de transformación tanto para la muestra **A** (con histidina marcada) como para la muestra **B** (histidina no marcada) es similar. Por otro lado, en la muestra **C** (control) el contenido de histidina es muy inferior y también va disminuyendo, pero de manera más lenta que las otras dos.



**Figura 6.18.** Espectros de RMN de protón de dos muestras, una de vino con histidina añadida (A) y otra de vino sin añadir histidina (B, ampliada la intensidad para observar las señales). Con un recuadro se indica la señal de histidina empleada para la cuantificación.



**Figura 6.19.** Evolución de la histidina en g/L medidos mediante RMN de protón en la muestra A (histidina marcada), muestra B (histidina sin marcar) y muestra C (control).

Como conclusión de este trabajo, podemos decir que tal y como se observó con los aminoácidos fenilalanina, isoleucina y leucina, el aminoácido histidina también es transformado en su alcohol superior, histaminol. La producción del histaminol tiene lugar por acción de las levaduras exclusivamente, mediante el mecanismo de Ehrlich. El único origen posible del histaminol detectado en estos vinos es la histidina añadida al comienzo del estudio, de modo que se podría proponer un cambio de nomenclatura: de histaminol a histidinol.

Por otro lado, no se observa en ningún caso la aparición de histamina, pudiendo confirmar que en el proceso de fermentación alcohólica no hay conversión de histidina a histamina.



### 6.3.2. Fermentación maloláctica: transformación del aminoácido histidina en histamina

El vino utilizado fue tinto, de la variedad Tempranillo (*Vitis vinífera*) perteneciente a Bodegas Patrocinio S.C.L. en Uruñuela, La Rioja. Este vino había realizado la fermentación alcohólica en bodega siguiendo una metodología tradicional de vinificación de vino tinto. Una vez finalizada la fermentación alcohólica fue recogido para realizar la fermentación maloláctica de modo controlado en nuestro laboratorio.

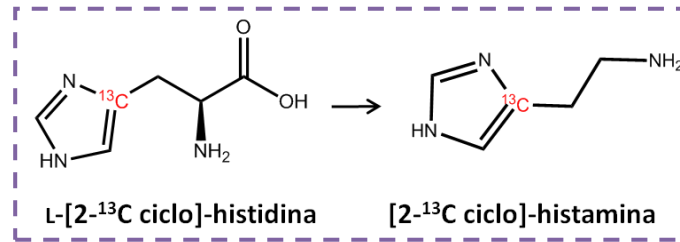
- **Mediante bacterias lácticas autóctonas de la bodega**

La fermentación maloláctica se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer introducidos en un baño termostatzado a 25°C y cada vino fue activado con heces de bacterias lácticas autóctonas recogidas en Bodegas Patrocinio S.C.L. Se hizo el seguimiento de la fermentación maloláctica mediante RMN de protón usando el método de cuantificación descrito en el Capítulo 4.

Para seguir la transformación de la histidina durante la fermentación maloláctica, se añadieron 20.0 mg de aminoácido marcado isotópicamente con carbono-13 en 250 mL de vino, con el fin de obtener una concentración final de 79.2 mg/L de L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina. Del mismo modo, se añadieron 19.0 mg a otro Erlenmeyer de aminoácido sin marcar isotópicamente, con el fin de tener una concentración de 75.2 mg/L. La señal de este aminoácido sin marcar no se detectará en el espectro de carbono-13 pero si en el de protón. La concentración de histidina empleada en los dos casos se encuentra dentro del rango de concentración presente en el vino.<sup>10</sup>

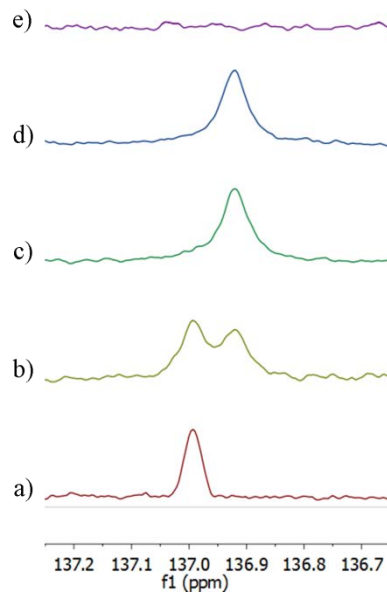
En todos los casos, las microfermentaciones fueron llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer usando 250 mL de vino con la histidina marcada (muestra A), otro con

histidina sin marcar (muestra **B**) y otro sin añadir aminoácido (muestra **C**). La fermentación maloláctica transcurrió bajo condiciones normales de temperatura (25 °C) y se recogieron 1.5 mL de muestra en diferentes intervalos (1, 4, 7, 10, 15 y 60 días). La fermentación maloláctica fue seguida mediante RMN de protón, observando la transformación del ácido málico (2.83 ppm) en ácido láctico (1.40 ppm). La histidina se transforma en la histamina por la acción de las bacterias lácticas (Figura 6.19).



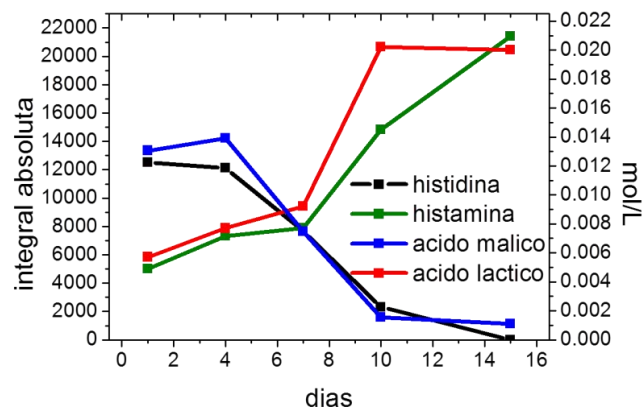
**Figura 6.20.** Ruta de transformación de la L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina en [2-<sup>13</sup>C ciclo]-histamina.

En este caso, la fermentación maloláctica se realizó en apenas 15 días y casi desde el principio las bacterias lácticas transformaron la histidina en histamina. En el día 4 ya se observa señal de histamina (136.9 ppm) y en el día 15 se deja de detectar la señal de histidina (137.0 ppm) (Figura 6.21). Para corroborar el hecho de que la señal nueva aparecida en el espectro corresponde con la de la histamina se obtuvo el espectro de RMN de carbono-13 de su patrón comercial.



**Figura 6.21.** Espectros de RMN de carbono-13 del seguimiento de transformación del aminoácido L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina en [2-<sup>13</sup>C ciclo]-histamina: a) 1 día, b) 4 días, c) 15 días y d) 60 días y e) muestra control sin añadir aminoácido a 60 días.

Se comparó la evolución del consumo de la histidina con el de la transformación del ácido málico a ácido láctico a lo largo de la fermentación maloláctica. En la Figura 6.22 se puede observar como las cinéticas de ambas transformaciones fueron paralelas y el contenido de histidina era casi nulo cuando también lo era el del ácido málico.



**Figura 6.22.** Evolución de la histidina y la histamina (por RMN de carbono-13 y expresado en integral absoluta) y de los ácidos málico y láctico (por RMN de protón y expresado en mol/L).

Por lo tanto, las bacterias lácticas no solo transforman la histidina en histamina al comienzo de la fermentación maloláctica como modo de multiplicarse, sino que la histidina es consumida a lo largo de toda la fermentación maloláctica.

- **Mediante preparados comerciales de bacterias lácticas**

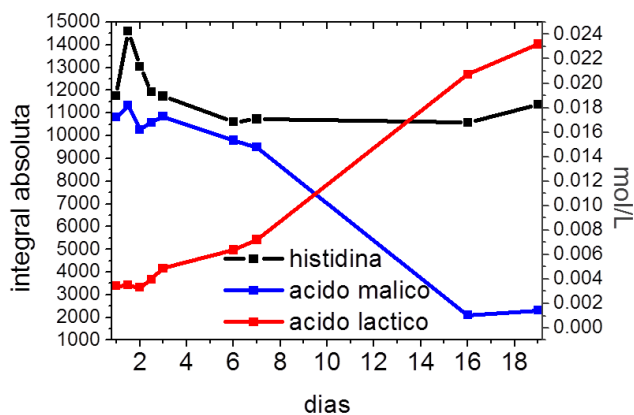
La fermentación maloláctica se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer introducidos en un baño termostático a 25°C y cada vino fue activado con bacterias Uvaferm Alpha®, a razón de 2.5 g/hL, tal y como especifica el fabricante. Se hizo el seguimiento de la fermentación maloláctica mediante RMN de protón, usando el método de cuantificación descrito en el Capítulo 4.

Para seguir la transformación de la histidina durante la fermentación maloláctica, se añadieron 39.4 mg de aminoácido marcado isotópicamente con carbono-13 en 500 mL de vino, con el fin de obtener una concentración final de 78.0 mg/L de L-[2-<sup>13</sup>C ciclo]-histidina. Del mismo modo, se añadieron 41.0 mg a otro Erlenmeyer de aminoácido sin marcar isotópicamente, con el fin de tener una concentración de 81.0 mg/L. La señal de este aminoácido sin marcar no se

detectará en el espectro de carbono-13 pero si en el de protón. La concentración de histidina empleada en los dos casos se encuentra dentro del rango de concentración habitual en el vino.<sup>10</sup>

En todos los casos las microfermentaciones fueron llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer usando 500 mL de vino con la histidina marcada (muestra **A**), otro con histidina sin marcar (muestra **B**) y otro sin añadir aminoácido (muestra **C**). La fermentación maloláctica transcurrió bajo condiciones normales de temperatura (25°C) y se recogieron 5 mL de muestra en diferentes intervalos (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 16, 19, 21, 23, 27, 30, 33, 37 días). La fermentación maloláctica fue seguida mediante RMN de protón, observando la transformación del ácido málico (2.83 ppm) en ácido láctico (1.40 ppm).

En este caso, no se observó un consumo relevante del aminoácido histidina y tampoco se detectó la presencia de histamina ni histaminol a lo largo de la fermentación maloláctica. Para controlar que la fermentación se estaba llevando a cabo, se realizó el seguimiento de los ácidos málico y láctico mediante la RMN de protón (Figura 6.23).



**Figura 6.23.** Evolución de la histidina (por RMN de carbono-13 y expresado en integral absoluta) y de los ácidos málico y láctico (por RMN de protón y expresado en mol/L).



Este hecho ha sido atribuido a que las bacterias comerciales tienen que cumplir, entre otros requisitos, el de no generar fácilmente histamina a partir de histidina.<sup>22</sup> De modo que al utilizar bacterias comerciales para realizar la fermentación maloláctica no se pudo observar la transformación del aminoácido y por lo tanto permanece más o menos constante a lo largo de la fermentación maloláctica.

Como conclusión se puede decir que la RMN es una herramienta importante e indispensable para el seguimiento de las rutas metabólicas de los aminoácidos durante la fermentación alcohólica de un vino. En este trabajo, los aminoácidos estudiados fenilalanina, leucina, isoleucina e histidina son consumidos completamente en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, transformándose en sus alcoholes superiores a través del mecanismo de Ehrlich. De esta manera, se puede asegurar que los aminoácidos presentes en la uva antes de la fermentación alcohólica fueron consumidos completamente durante la misma y que los aminoácidos presentes en el vino, una vez finalizada la fermentación, proceden de otras rutas metabólicas de la levadura.

Por otro lado queda demostrado que el empleo de determinadas bacterias lácticas pueden controlar de forma efectiva la presencia de histamina después de la fermentación maloláctica, un factor muy importante en la actuación para la exportación de vino a ciertos países.

---

<sup>22</sup> Suarez Lepe, J.A.; Iñigo, B. *Microbiología enológica: fundamentos de vinificación*, 3ªEd. Mundi-prensa 2004.



## **Capítulo 7**

### **Conclusiones**



1. A lo largo de esta tesis se ha demostrado el enorme potencial que tiene la RMN en el mundo del vino, no sólo a nivel de análisis cuantitativo de compuestos, sino también a la hora de clasificar vinos y en el seguimiento metabólico del proceso de vinificación.

## 2. Capítulo 4

Se ha puesto a punto la metodología de cuantificación mediante espectros de RMN de protón en muestras de vino, siguiendo la metodología puesta a punto por Pauli (qHNMR). Dicha técnica, aplicada a vino, ha sido validada frente a otras técnicas analíticas como el test enzimático e infrarrojo (Foss WineScan<sup>TM</sup> FT 120), obteniéndose muy buenos resultados.

La RMN cuantitativa ha sido utilizada a lo largo del capítulo 4 para estudiar la evolución de numerosos compuestos como etanol, aminoácidos, ácidos orgánicos y polifenoles, a lo largo del proceso de elaboración de un vino. Así, se analizaron muestras de mosto y vino durante la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica y la crianza en bodega.

También se ha puesto a punto la metodología en la monitorización de la fermentación alcohólica en un tubo de RMN con apenas 450  $\mu$ L de mosto, cuantificando los principales metabolitos involucrados en el proceso.

## 3. Capítulo 5

Se ha demostrado que los vinos de Rioja pueden ser eficientemente explorados por medio de los espectros de RMN de protón de vinos y mostos junto con técnicas quimiométricas.

Así, las 111 muestras recogidas en la D.O.Ca. Rioja han podido ser clasificadas empleando análisis de componentes principales (PCA) en función del proceso de vinificación, las regiones y en cierta medida, también las añadas.

Por otra parte, aplicando ECVA y iECVA sobre los espectros de RMN de protón, las 111 muestras fueron clasificadas incluso a nivel de bodega individual. Se encontró un intervalo en el espectro de RMN de protón que contenía la información suficiente para discriminar entre las bodegas. En dicho intervalo estaban presentes las señales del isopentanol y del isobutanol, las cuales presentamos como biomarcadores importantes para el *terroir* de La Rioja.

#### 4. Capítulo 6

En este capítulo se ha demostrado que la RMN de carbono-13 es una importante herramienta para el estudio metabólico de los aminoácidos durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica de un vino. Mediante esta técnica se ha podido observar el momento de transformación de los aminoácidos y también qué alcohol y amina aportan al medio.

En este trabajo se ha observado como los aminoácidos estudiados son transformados en sus alcoholes superiores en los primeros momentos de la fermentación alcohólica a través del mecanismo de Ehrlich. Podemos asegurar que los aminoácidos presentes en la uva fueron consumidos durante la misma y por lo tanto, los aminoácidos presentes en el vino no proceden de la uva. Son subproductos de otras rutas metabólicas de la levadura y de sus propias lías.

Por otro lado, se ha demostrado como el empleo de determinadas bacterias lácticas puede controlar la aparición de histamina durante la fermentación maloláctica de un vino.

**ARTÍCULOS EN PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**

1. “A Thorough Study on the Use of Quantitative  $^1\text{H}$  NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes” López-Rituerto, E.; Cabredo, S.; López, M.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M., *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2112-2118.
2. “Evidence of Metabolic Transformations of Amino Acids into Higher Alcohols through  $^{13}\text{C}$  NMR Studies of Wine Alcoholic Fermentation” López-Rituerto, E.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M., *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4923-4927.
3. “Permanence of yeast inocula in the winery ecosystem and presence in spontaneous fermentations” Santamaría, P.; López, R.; López, E.; Garijo, P.; Gutiérrez, A.R. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *227*, 1563–1567.
4. “Investigations of La Rioja terroir for wine production using  $^1\text{H}$  NMR metabolomics” López-Rituerto, E.; Savorani, F.; Avenoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M.; Engelsen, S.B. *J. Agric. Food Chem.* **En proceso de revisión.**

**OTROS ARTÍCULOS**

1. “Relación entre el momento de inoculación de bacterias lácticas y la composición del vino” Santamaría, P.; Garijo, P.; Gutiérrez, A.R.; Tenorio, C.; López, R.; López, E. *La Semana vitivinícola*, ISSN 0037-184X, **2006**, *3146*, 3958–3962.
2. “Resonancia magnética nuclear de las fermentaciones” López-Rituerto, E.; Cabredo, S.; López, M.; Canal, N.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M., *La Semana vitivinícola*, ISSN 0037-184X, **2009**, *3275*, Págs. 2054–2060.

3. “Resonancia Magnética Nuclear en el vino. Seguimiento de las fermentaciones alcohólica y maloláctica en vinos de diferentes subzonas de la D.O.Ca. Rioja” López-Rituerto, E.; Avenzoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M., *Zubia*, ISSN 0213-4306, **2009**, 27, 203–220.

#### COMUNICACIONES EN CONGRESOS CIENTÍFICOS

1. **Póster y capítulo de libro:** “Seguimiento en continuo de microfermentaciones alcohólicas mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón”, pág. 271-273; ISBN 978-84-690-6060-5  
López-Rituerto, E.; Antón, I.; Avenzoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M. “IX Congreso Nacional de Investigación enológica (GIENOL)”, celebrado en Badajoz en mayo de 2007.
2. **Póster y capítulo de libro:** “Seguimiento metabólico de la fenilalanina en la fermentación alcohólica de un vino de la variedad garnacha mediante  $^{13}\text{C}$  RMN”, en CD, artículo 14 (15 págs.) ISBN 978-84-8125-306-1.  
López-Rituerto, E.; Avenzoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M. “VI Foro Mundial del Vino”, celebrado en Logroño en mayo de 2008.
3. **Póster:** “Empleo de la resonancia magnética en el mundo de la enología”  
López-Rituerto, E.; Canal, No.; Busto, J.H.; Avenzoza, A.; Peregrina, J. M. “Foro de la Innovación 08” celebrado en Logroño en noviembre de 2008.
4. **Póster y capítulo de libro:** “Seguimiento metabólico del aminoácido leucina durante la fermentación alcohólica de un vino mediante  $^{13}\text{C}$ -RMN”  
López-Rituerto, E.; Aydillo, C.; Avenzoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M. “X Congreso Nacional de Investigación enológica (GIENOL)”, celebrado en Badajoz en mayo de 2009.



5. **Póster, comunicación oral y capítulo de libro:** “Clasificación de vinos de La D.O.Ca. Rioja empleando resonancia magnética nuclear de protón y técnicas quimiométricas”, en CD, artículo 45 (10 págs.) ISBN 978-84-8125-336-8. López-Rituerto, E.; Busto, J.H.; Avenzoza, A.; Peregrina, J.M.; Engelsen, S.B.; Savorani, F.  
“VII Foro Mundial del Vino”, celebrado en Logroño en mayo de 2010.
6. **Póster:** “Elaboración de vinos de rioja mediante inducción simultánea de las fermentaciones alcohólica y maloláctica a partir de uva c.v. tempranillo a distintos pHs”  
López, R.; López, E.; Garijo, P.; Tenorio, C.; Gutiérrez, A.R.  
“XIII Congreso Nacional de Enólogos” celebrado en Logroño en mayo de 2007.
7. **Póster:** “La Rioja wine: a  $^1\text{H}$  NMR metabolomic investigation on terroirs and fermentation process”  
Savorani, F.; López-Rituerto, E.; Engelsen, S.B.  
“2<sup>nd</sup> International Conference on FOOD-OMICS” en Cesena (Italia) en Junio de 2011.





## **Capítulo 8**

### **Anexos de RMN**



En este apartado se presentan los espectros de RMN de protón más representativos de la evolución de distintos compuesto a lo largo de la elaboración de un vino.

La mayoría de los espectros de las muestras de mosto y vino han sido adquiridos tanto en el equipo de 400 como en el de 600 MHz para protón.

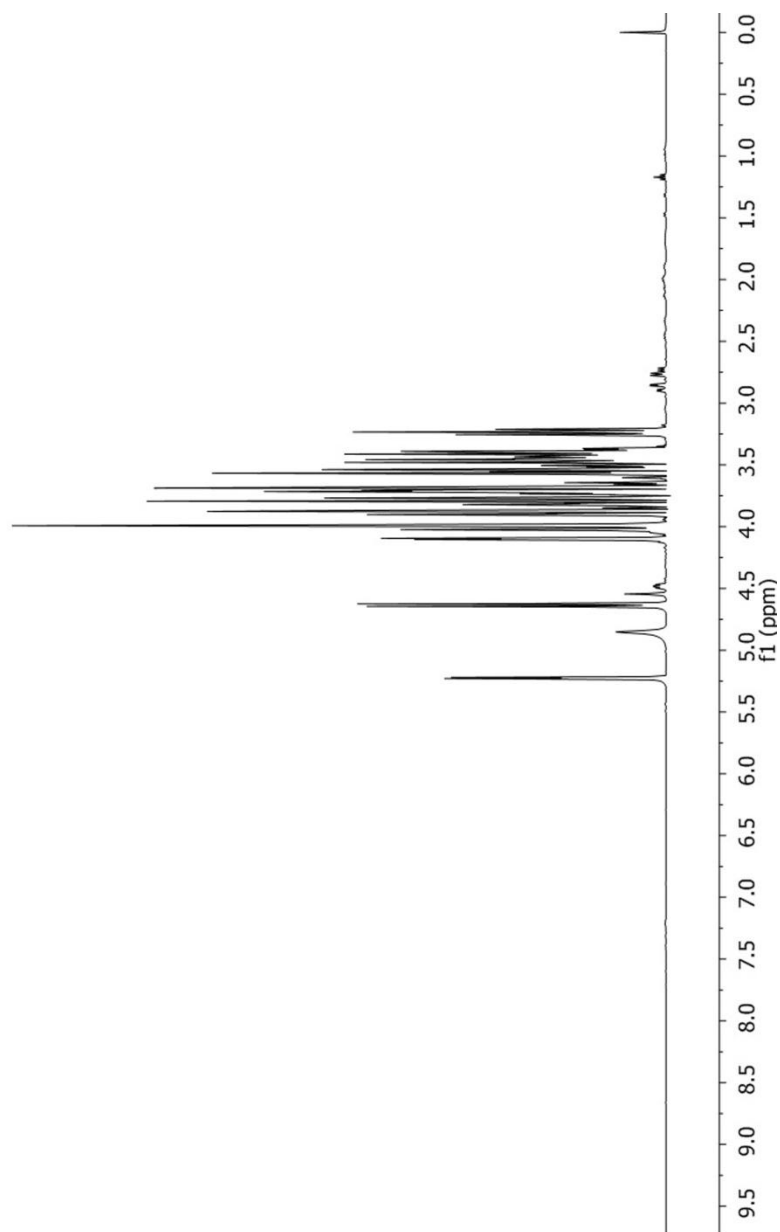
Con el fin de aportar una idea general de la transformación de los espectros de RMN de protón durante su evolución de mosto a vino, se presentan los espectros de las siguientes muestras:

- **mosto**
- **vino al final de fermentación alcohólica**
- **vino al final de fermentación maloláctica**
- **vino en un punto intermedio de su permanencia en barrica**

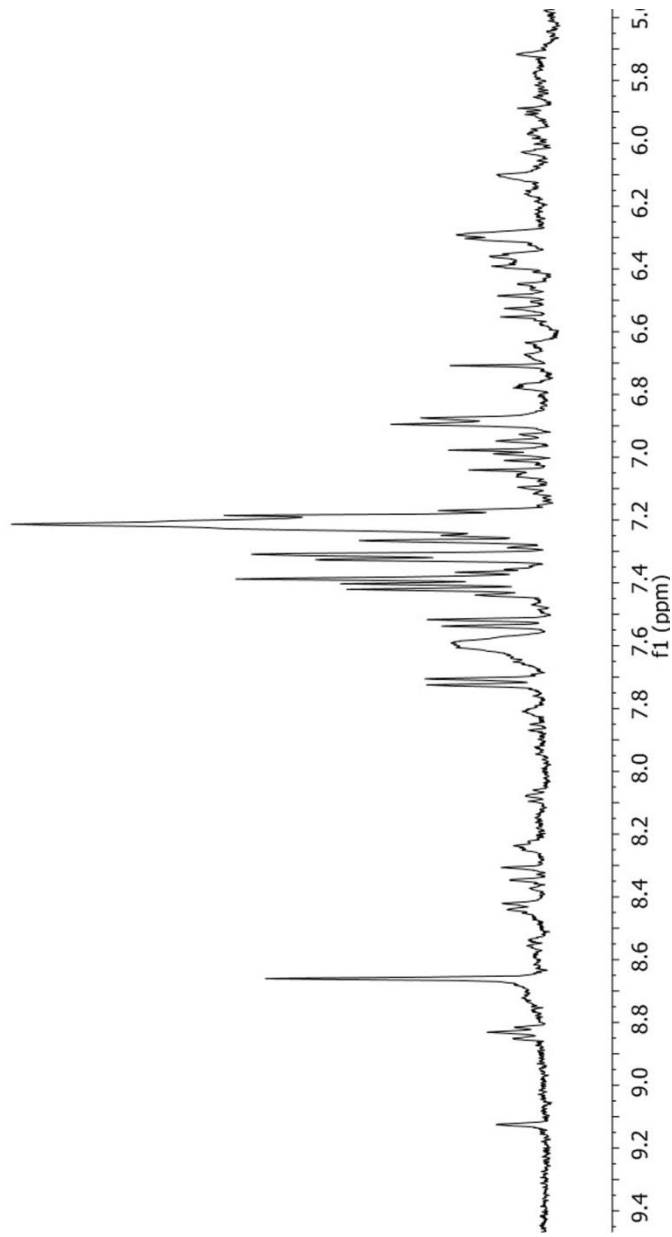


## 8.1. Espectros de RMN de protón de mosto

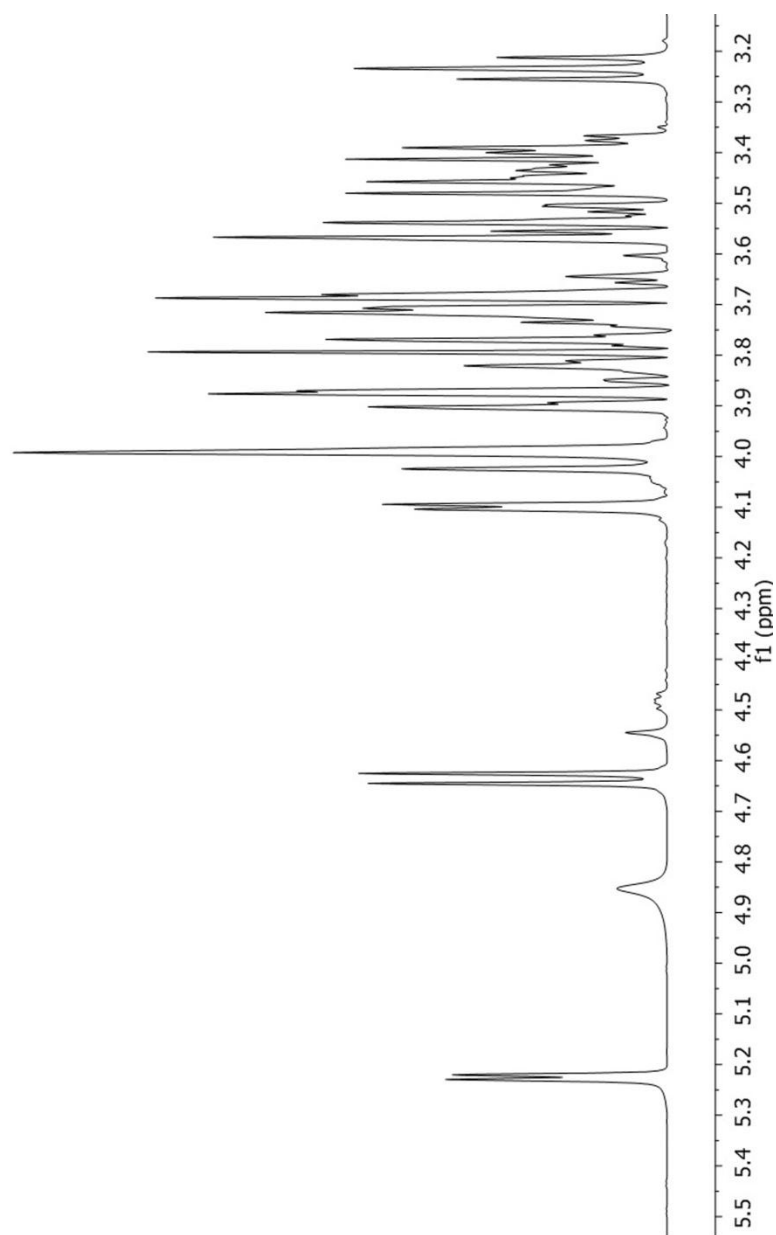
### 8.1.1. Espectro completo. 400 MHz para protón



## 8.1.2. Zona de compuestos aromáticos. 400 MHz para protón

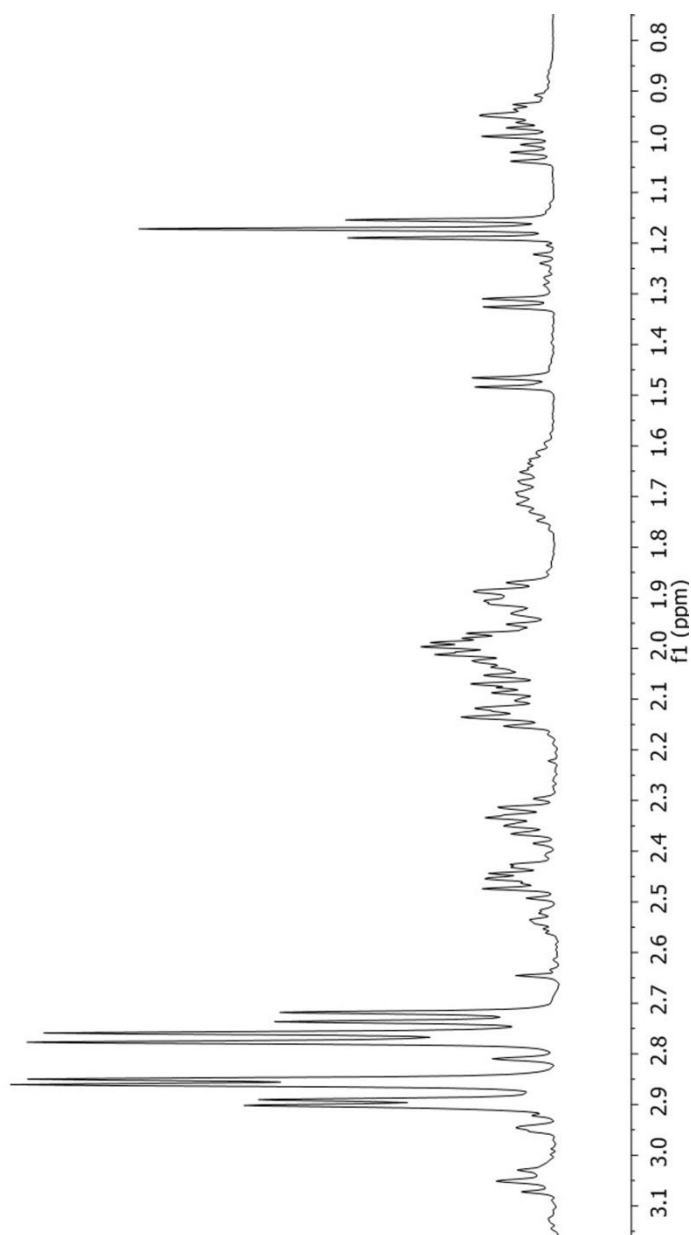


## 8.1.3. Zona de carbohidratos. 400 MHz para protón

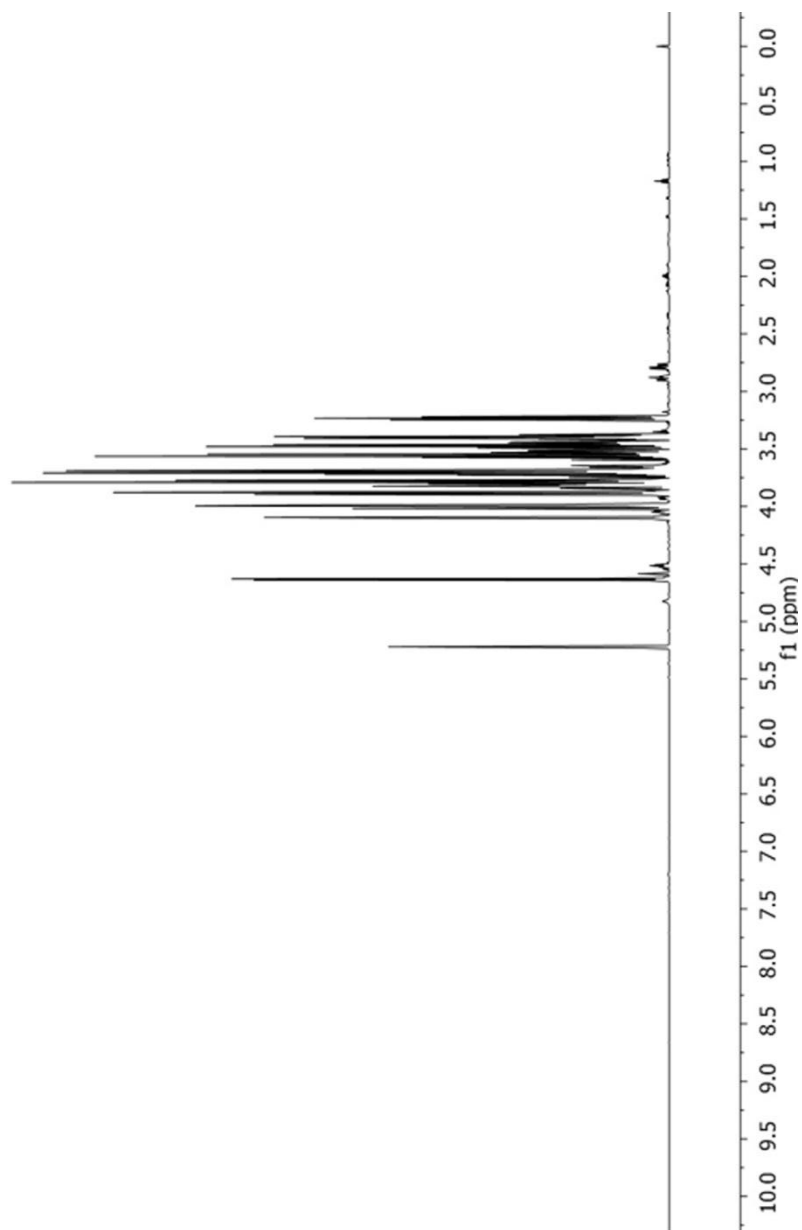




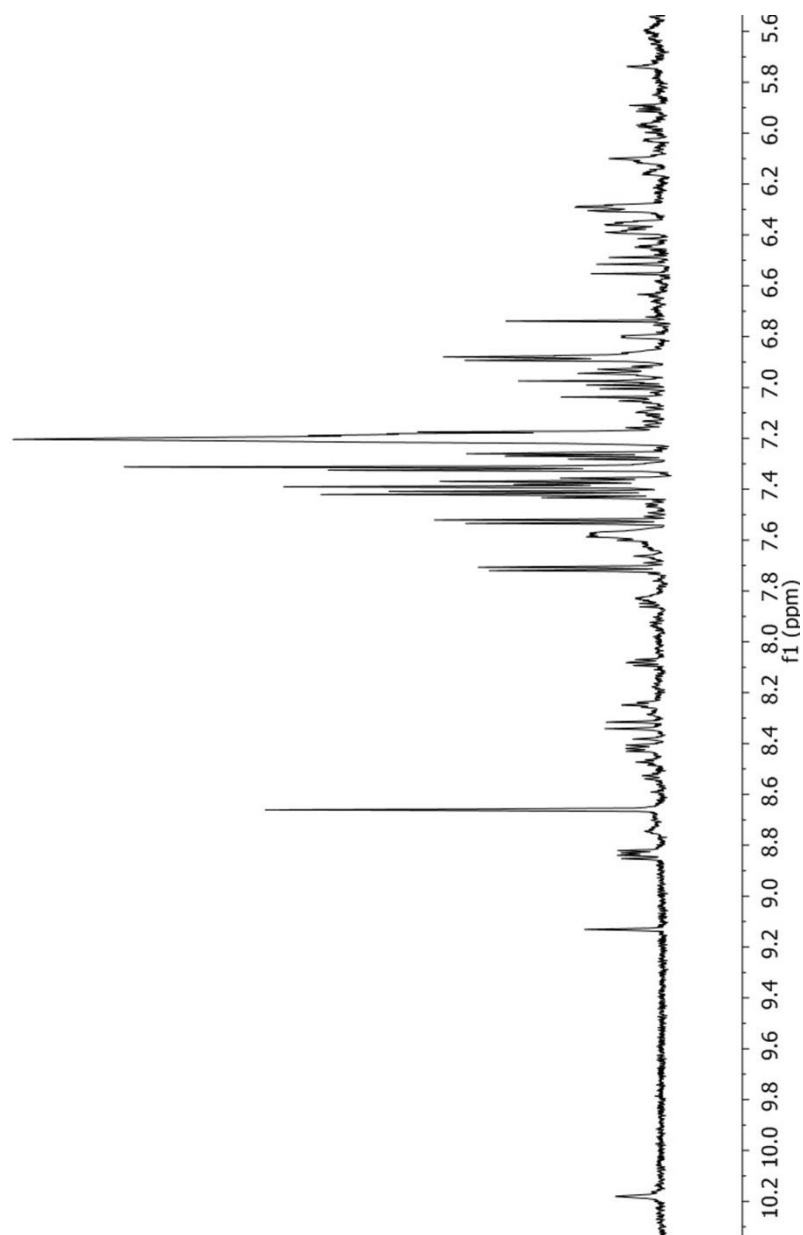
## 8.1.4. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 400 MHz para protón



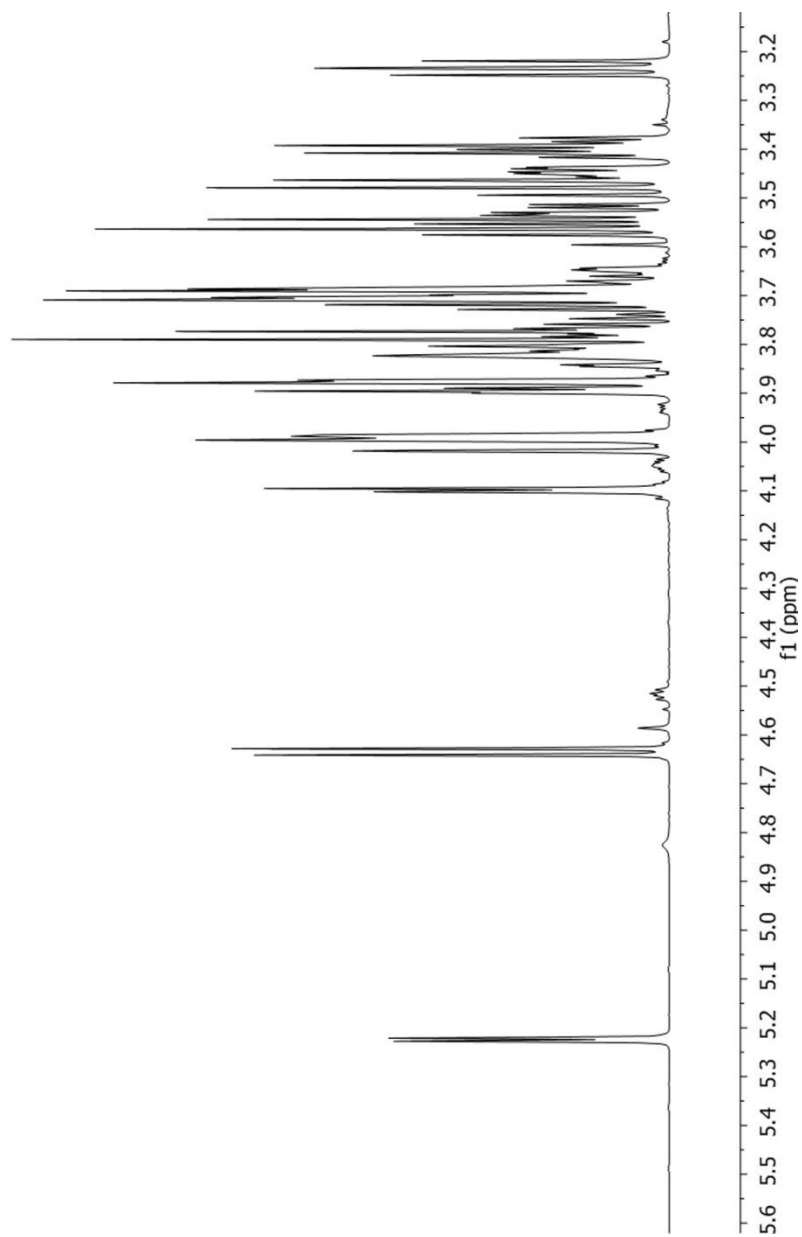
## 8.1.5. Espectro completo. 600 MHz para protón



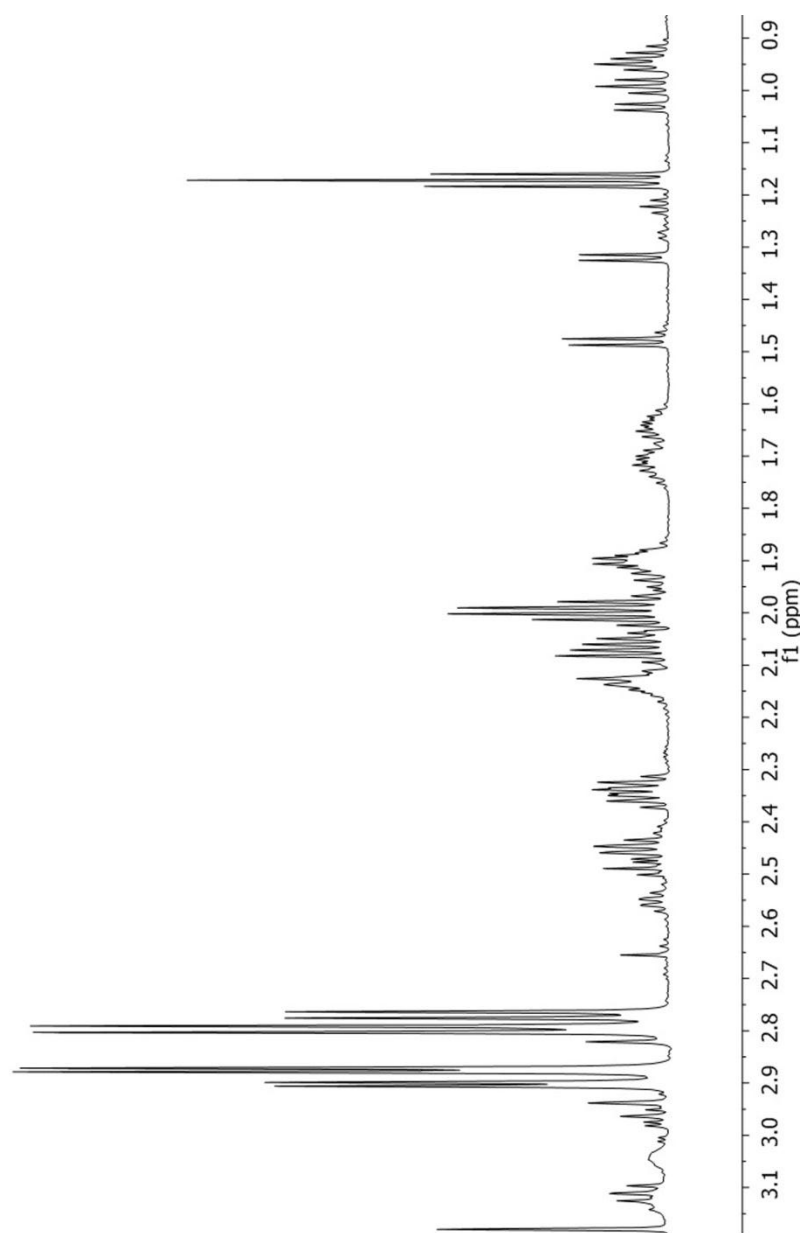
## 8.1.6. Zona de compuestos aromáticos. 600 MHz para protón



## 8.1.7. Zona de carbohidratos. 600 MHz para protón

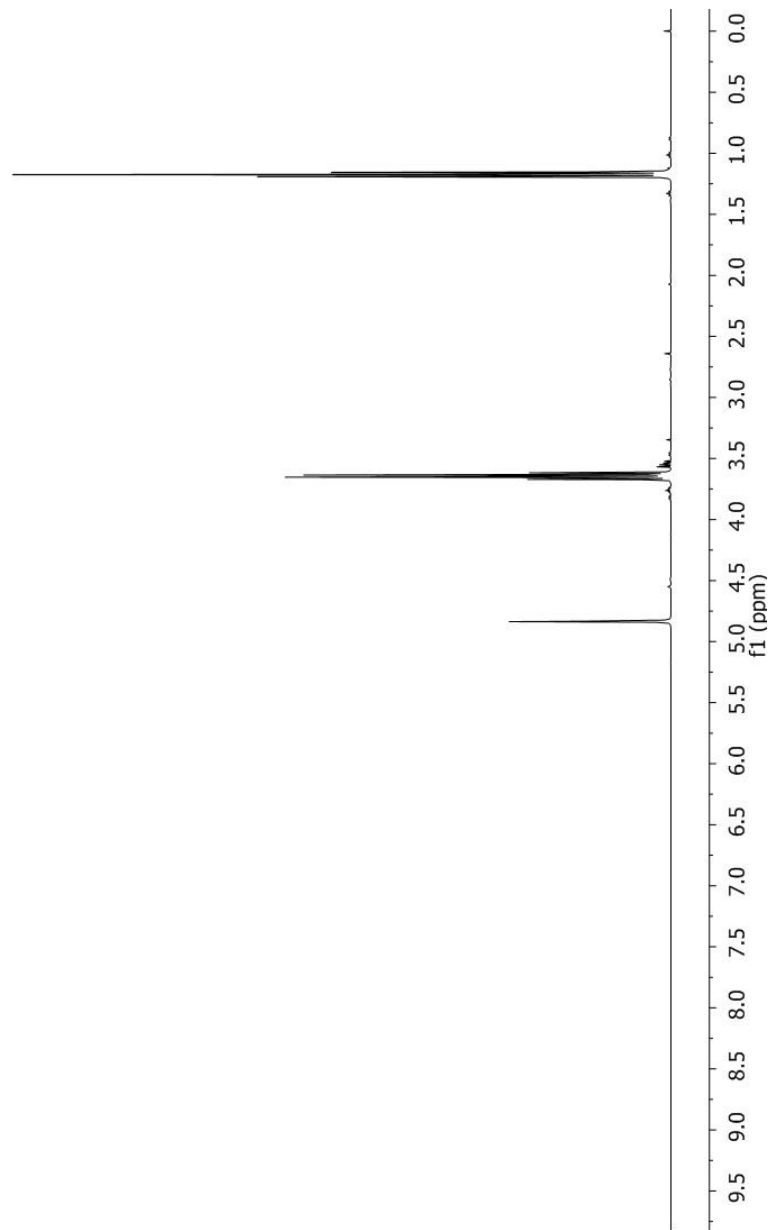


## 8.1.8. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 600 MHz para protón

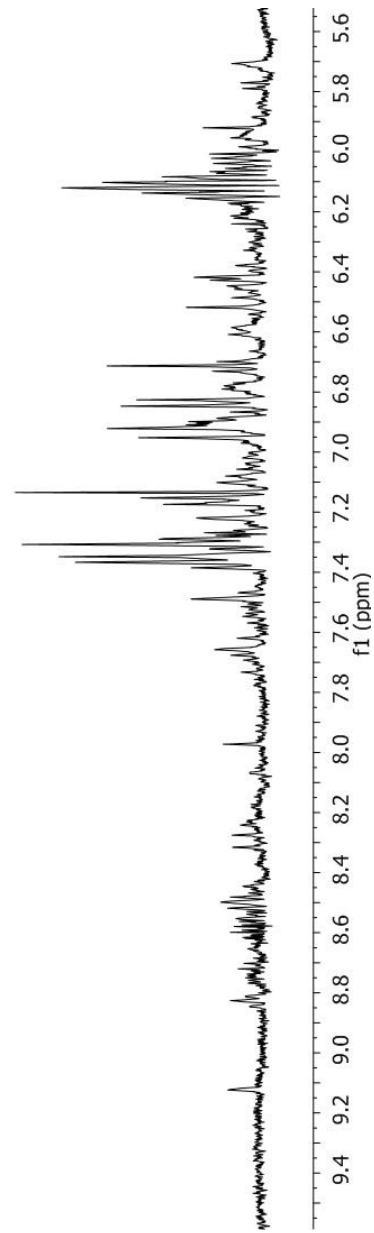


## 8.2. Espectros de RMN de protón de vino al final de la fermentación alcohólica

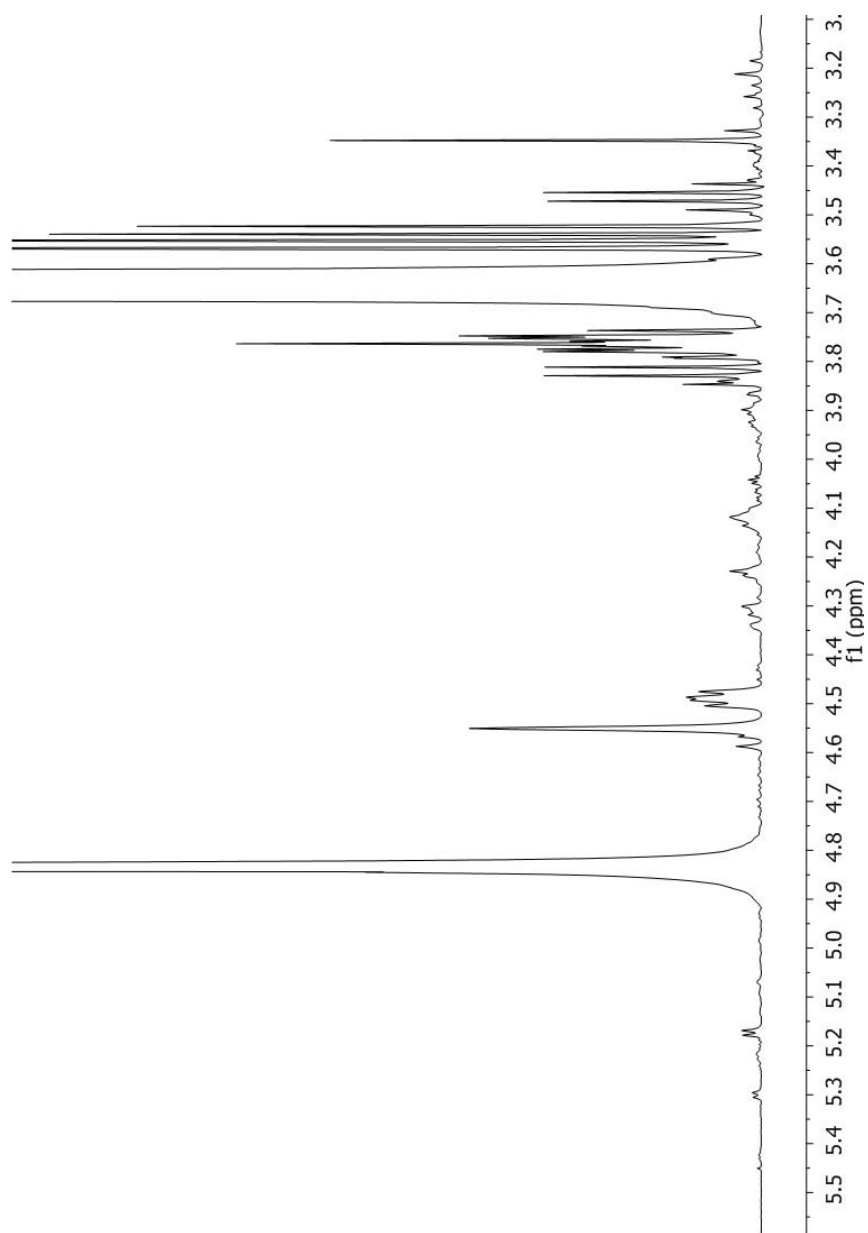
### 8.2.1. Espectro completo. 400 MHz para protón



## 8.2.2. Zona de compuestos aromáticos. 400 MHz para protón

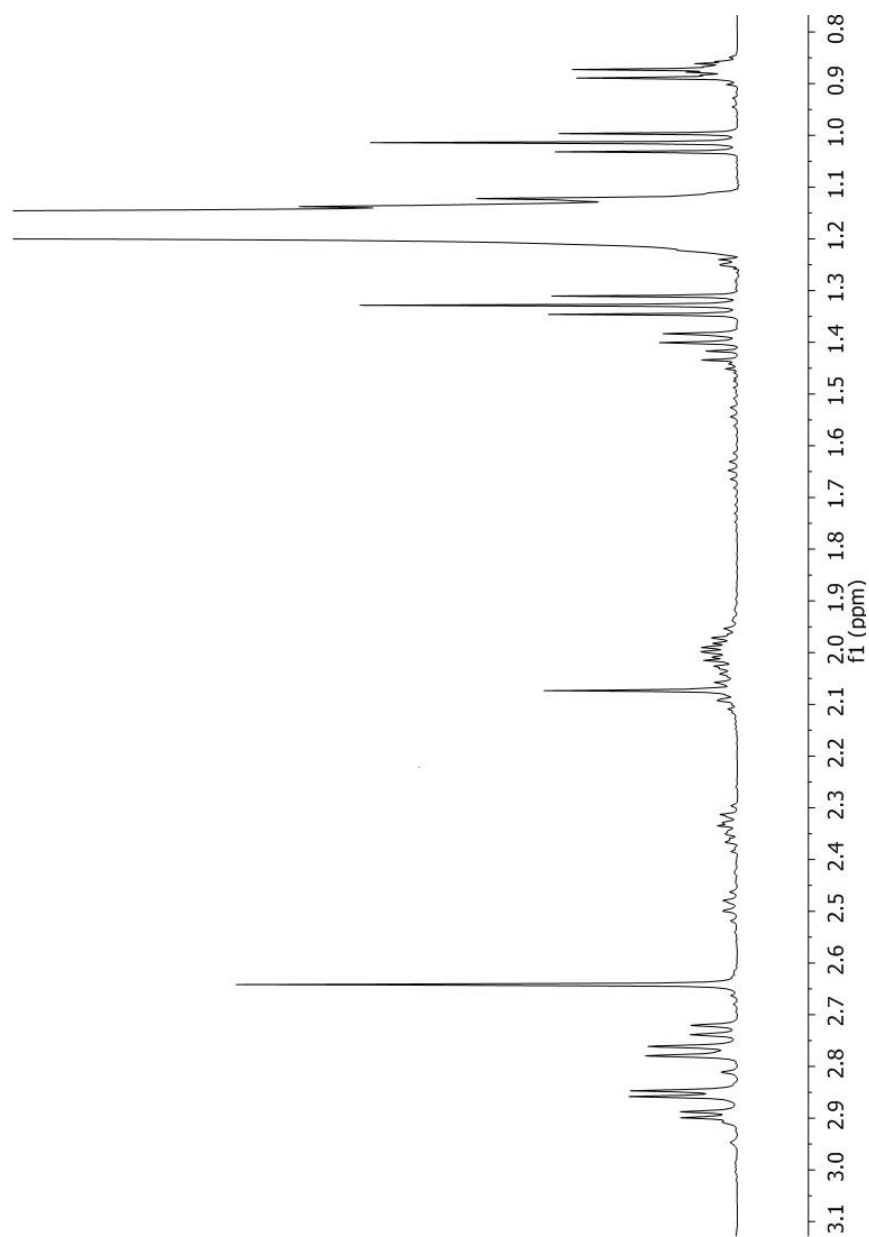


## 8.2.3. Zona de carbohidratos. 400 MHz para protón

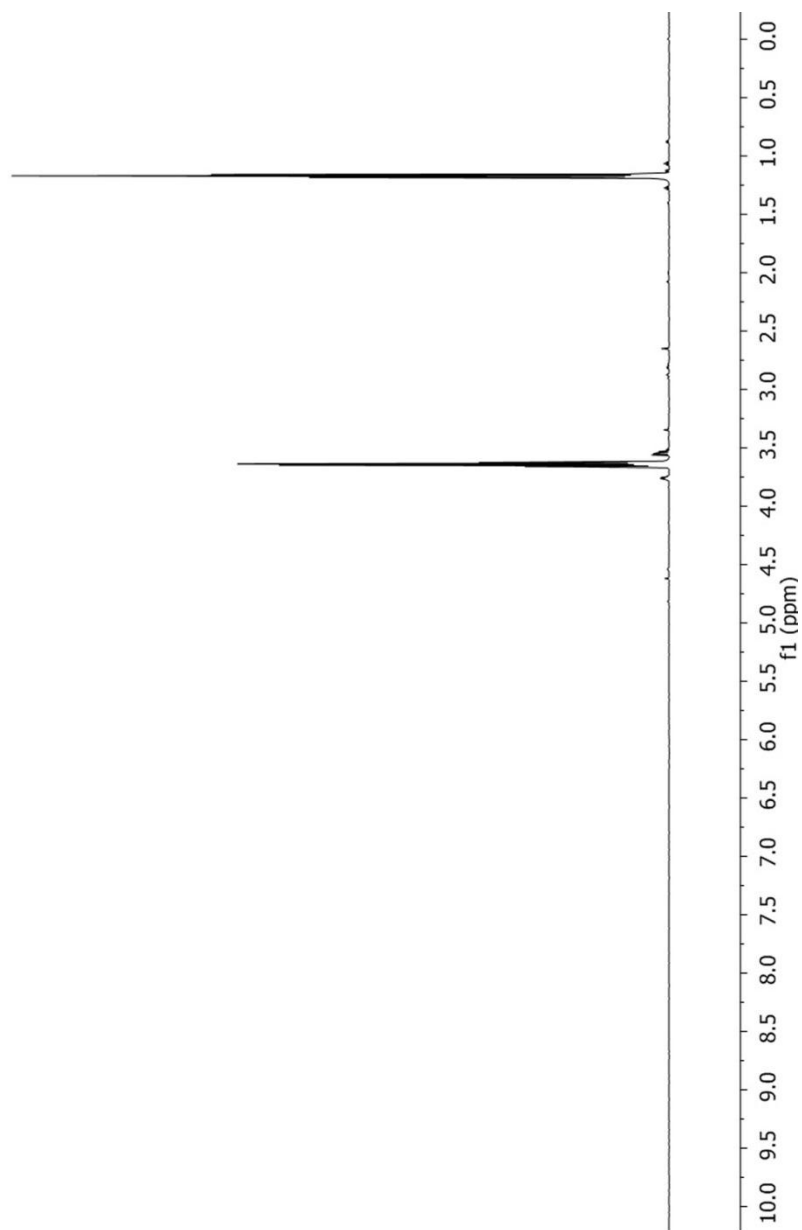




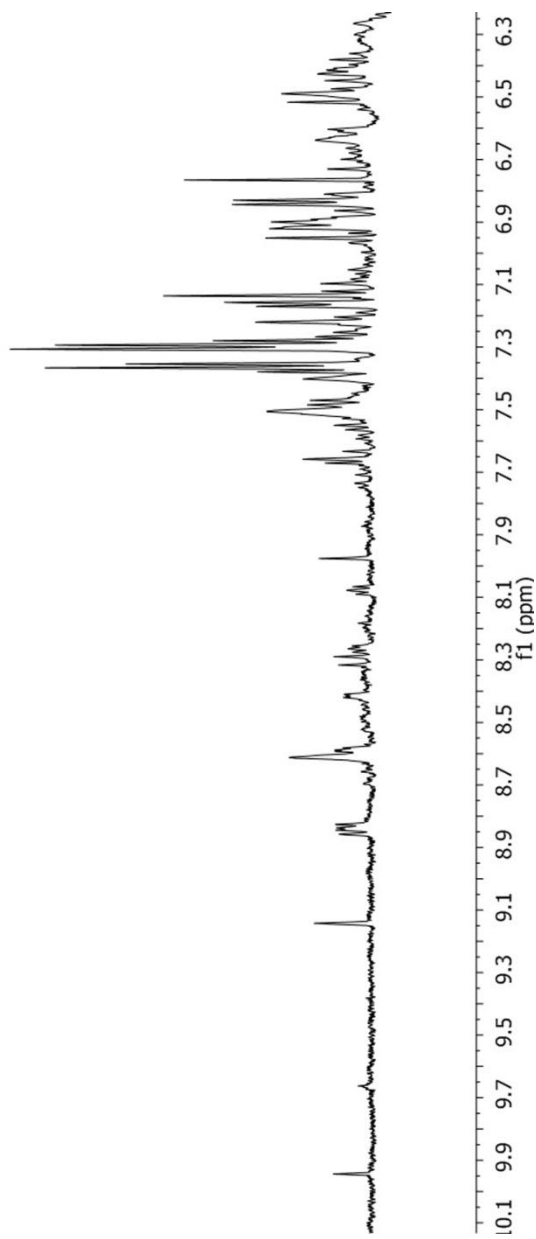
## 8.2.4. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 400 MHz para protón



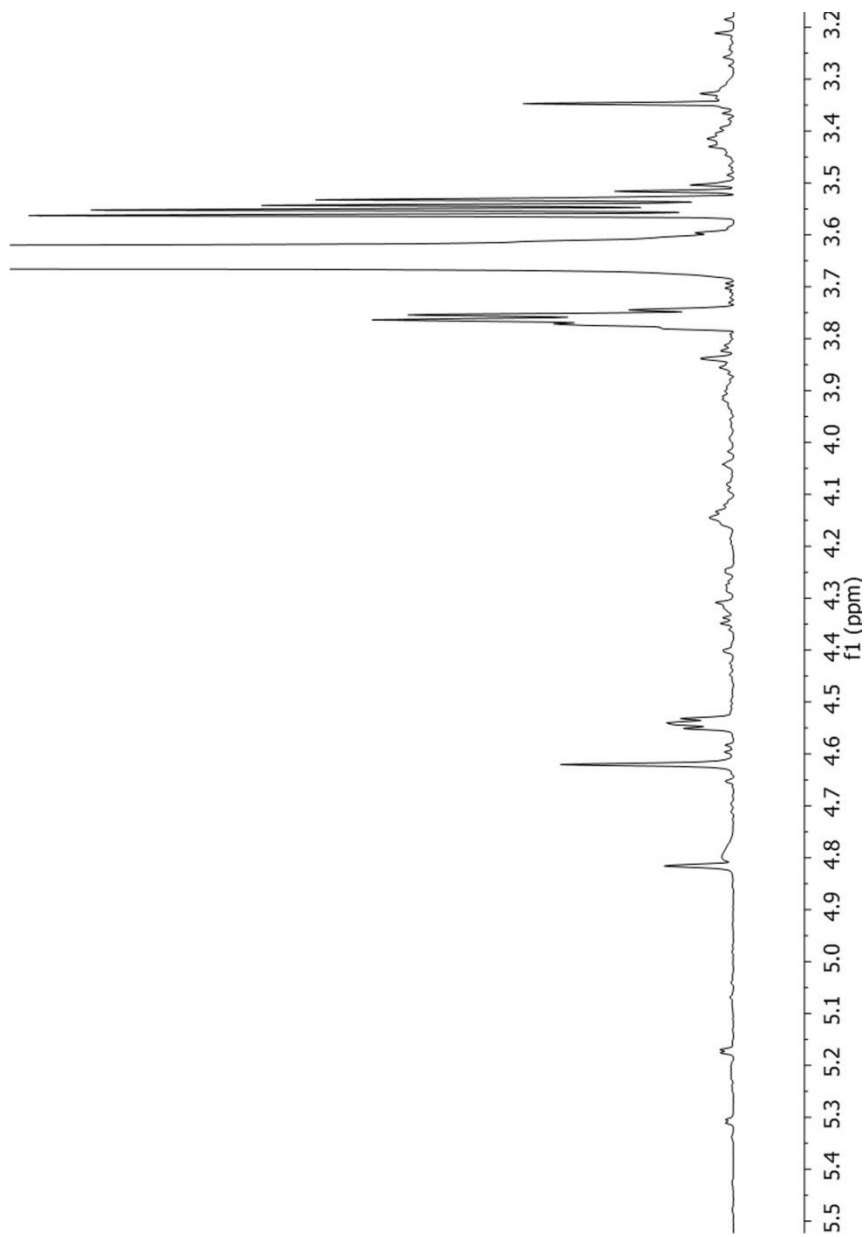
## 8.2.5. Espectro completo. 600 MHz para protón



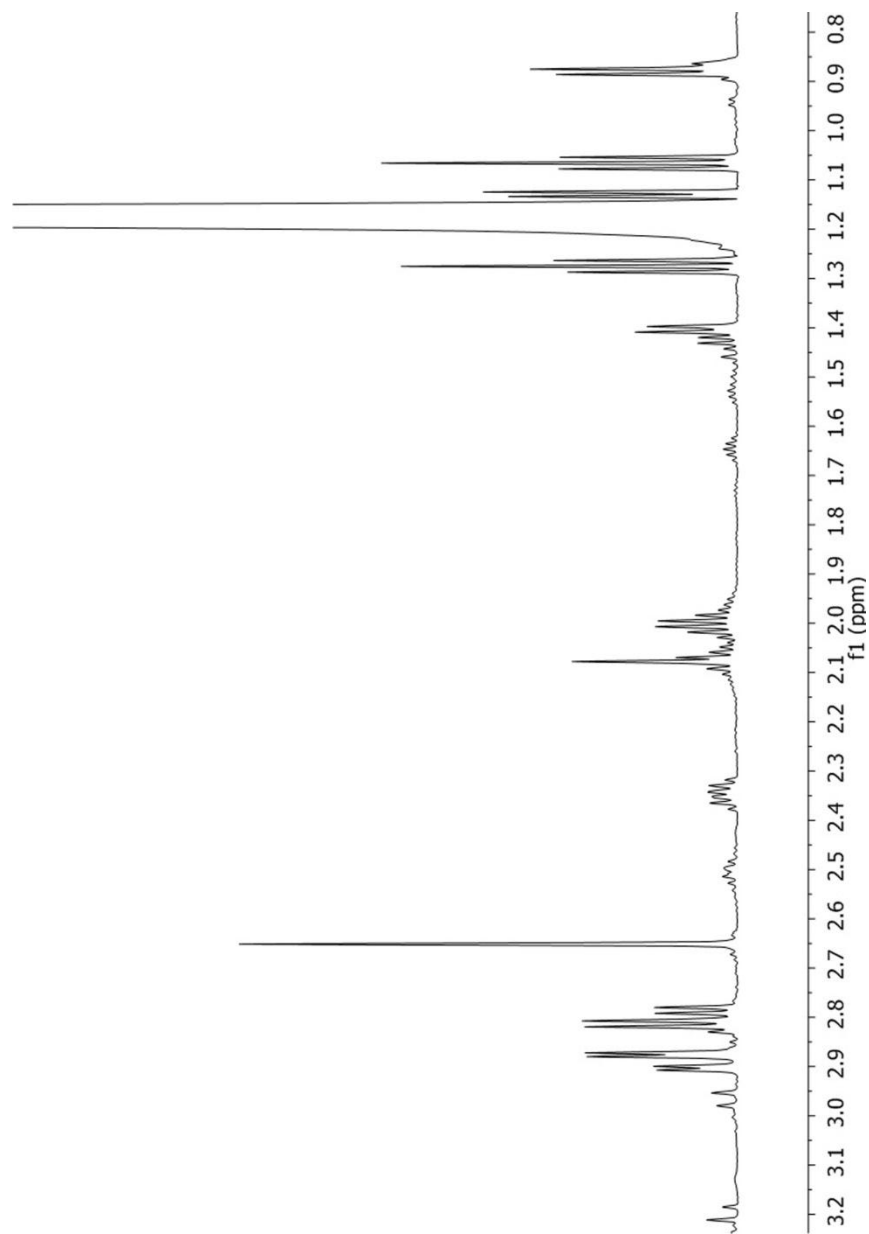
## 8.2.6. Zona de compuestos aromáticos. 600 MHz para protón



## 8.2.7. Zona de carbohidratos. 600 MHz para protón

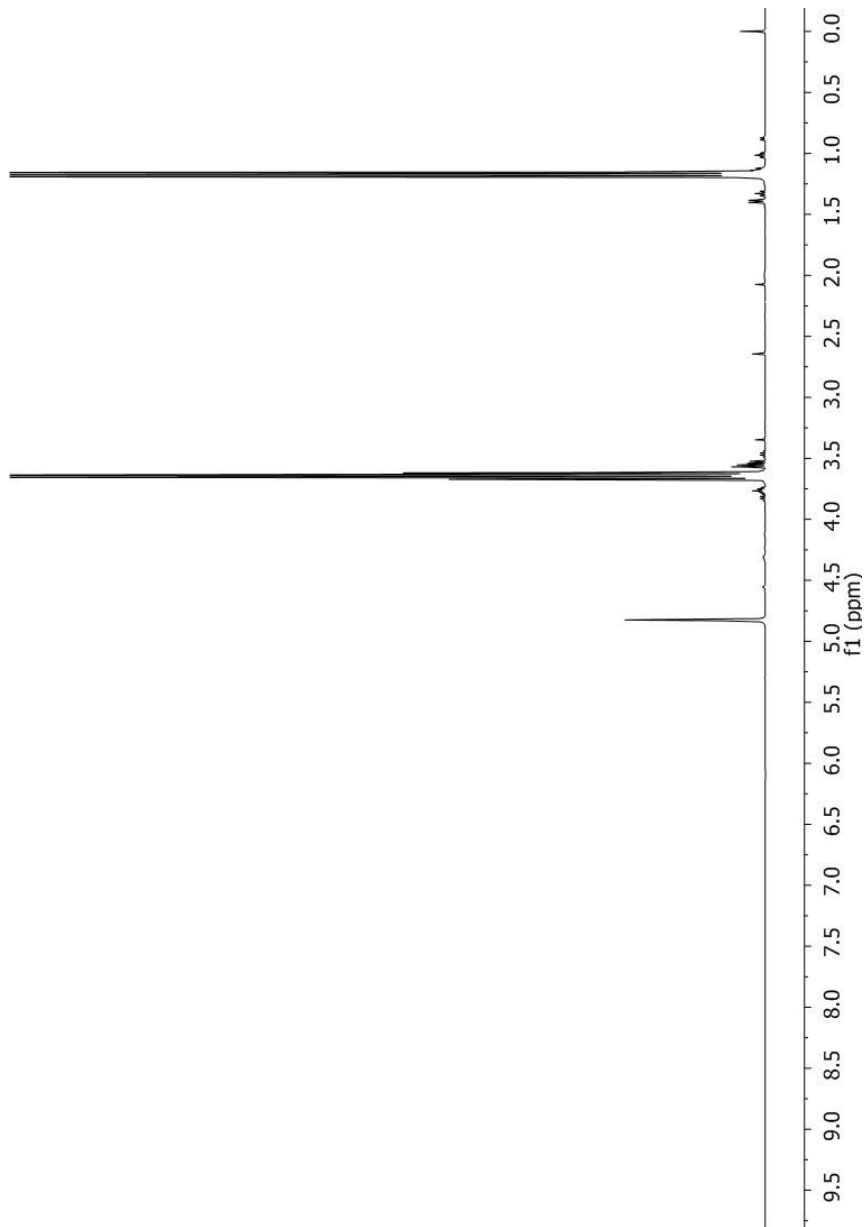


## 8.2.8. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 600 MHz para protón

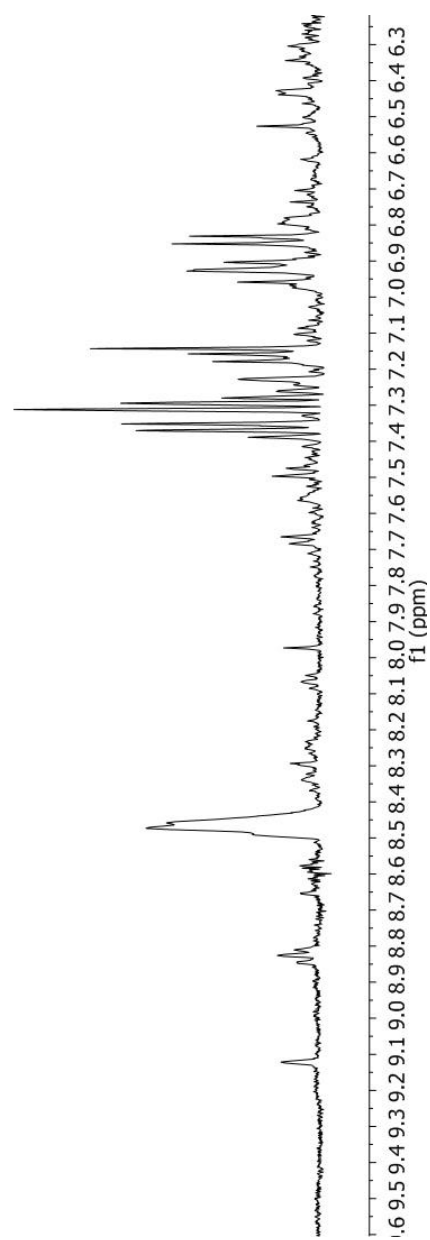


### 8.3. Espectros de RMN de protón de vino al final de la fermentación maloláctica

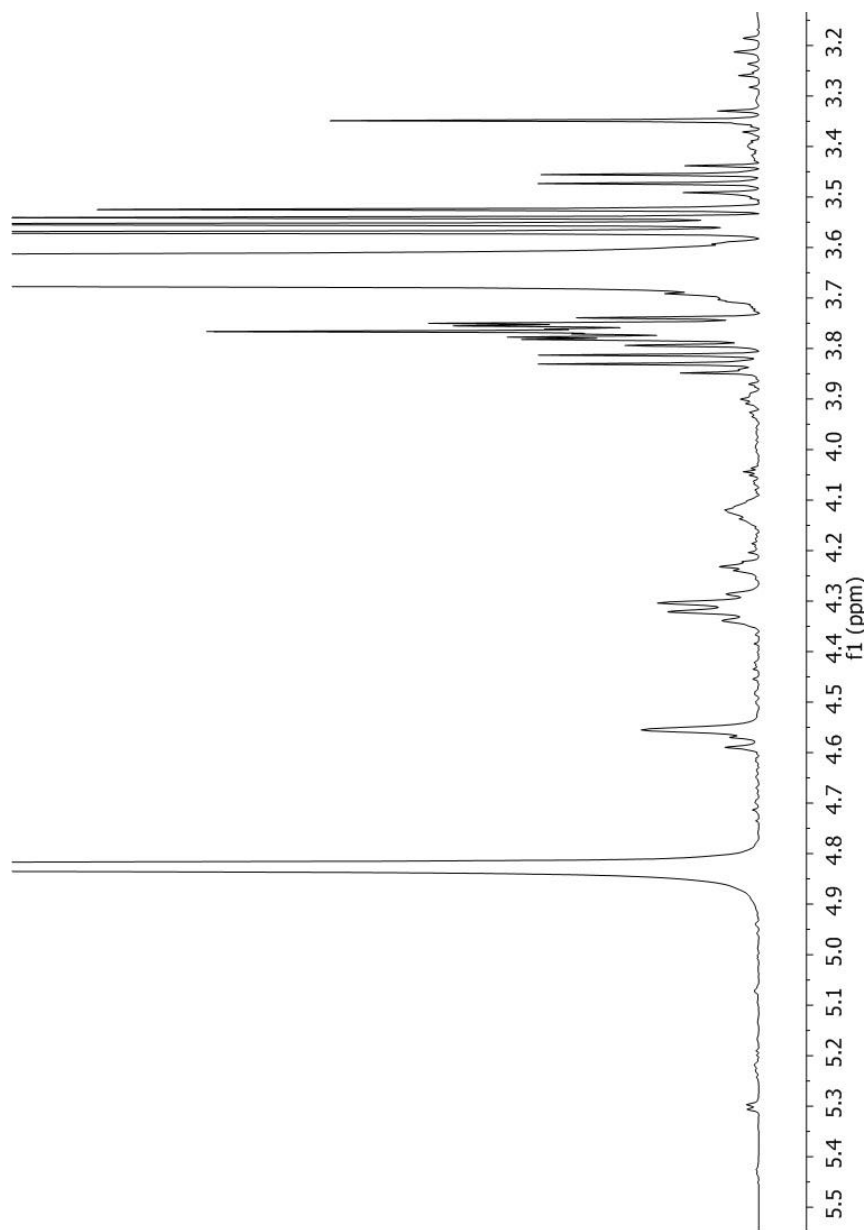
#### 8.3.1. Espectro completo. 400 MHz para protón



## 8.3.2. Zona de compuestos aromáticos. 400 MHz para protón

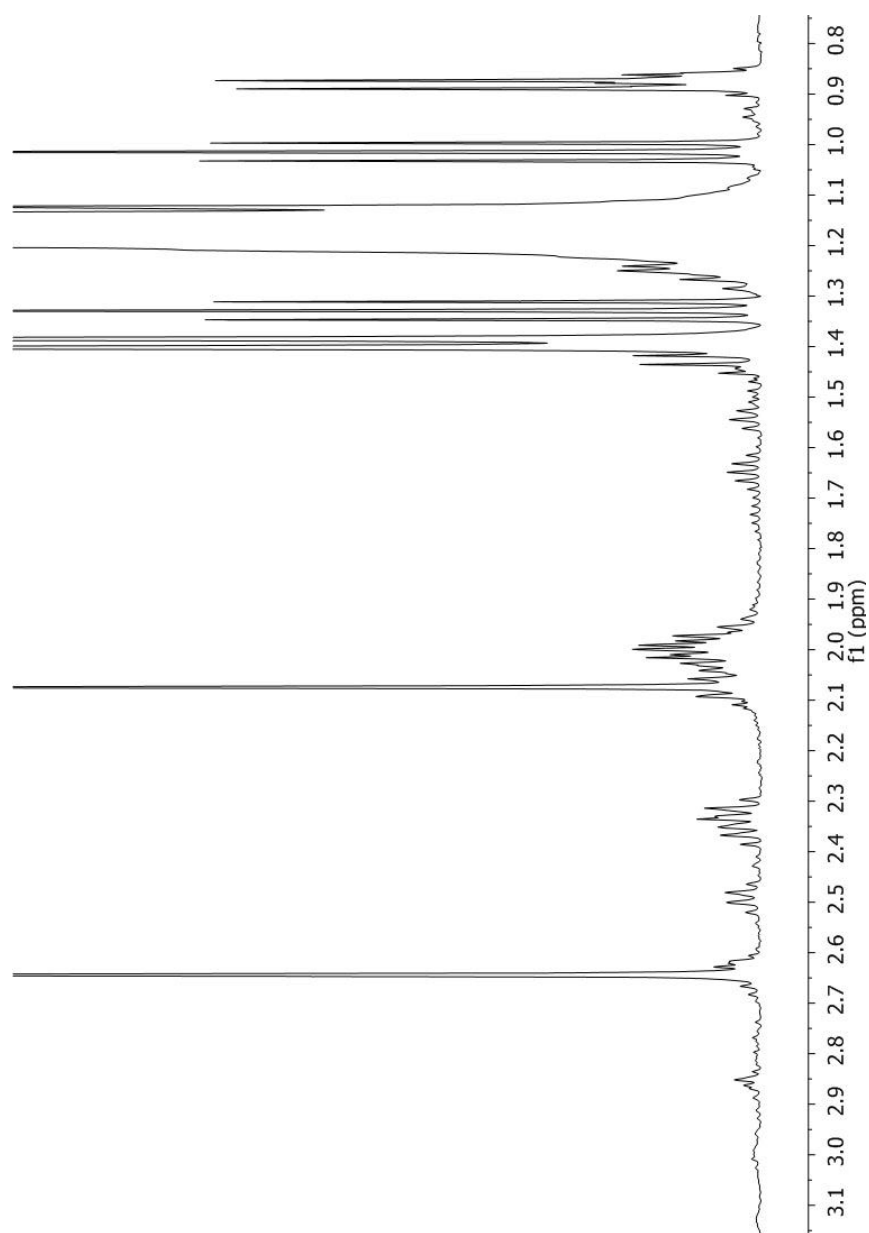


## 8.3.3. Zona de carbohidratos. 400 MHz para protón

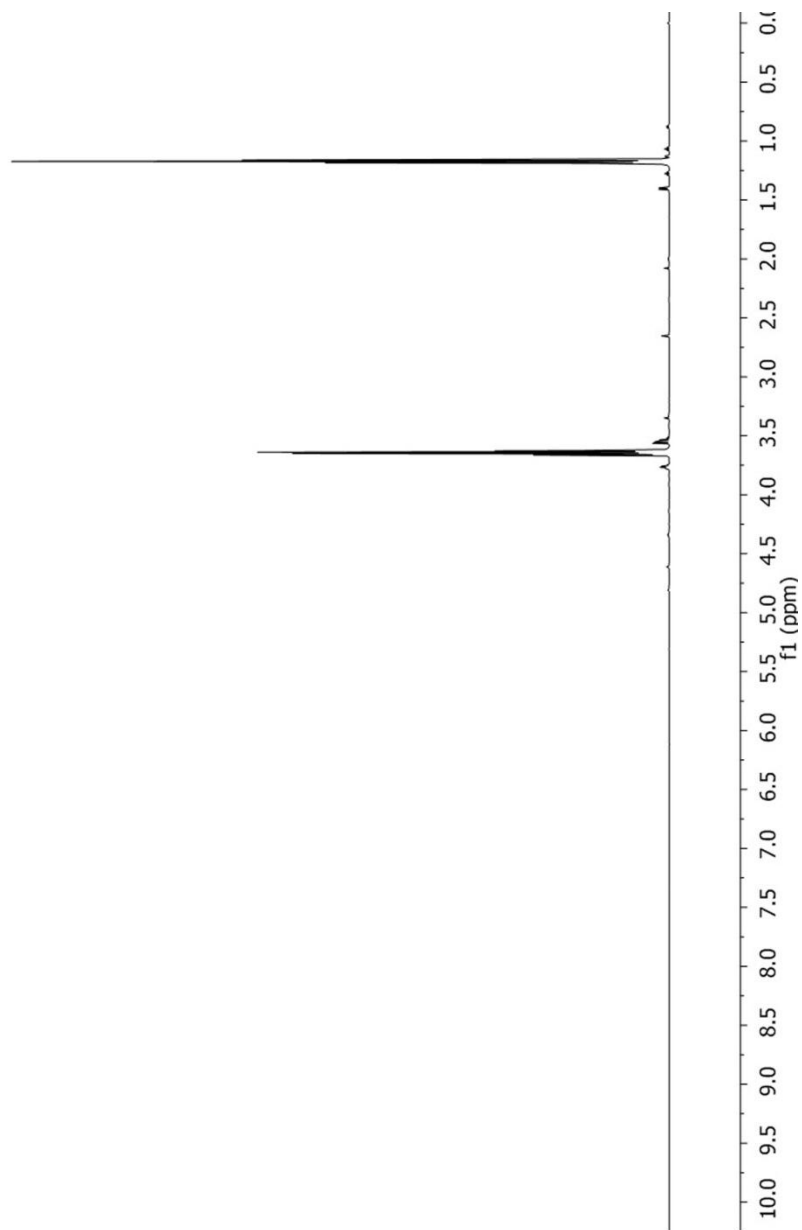




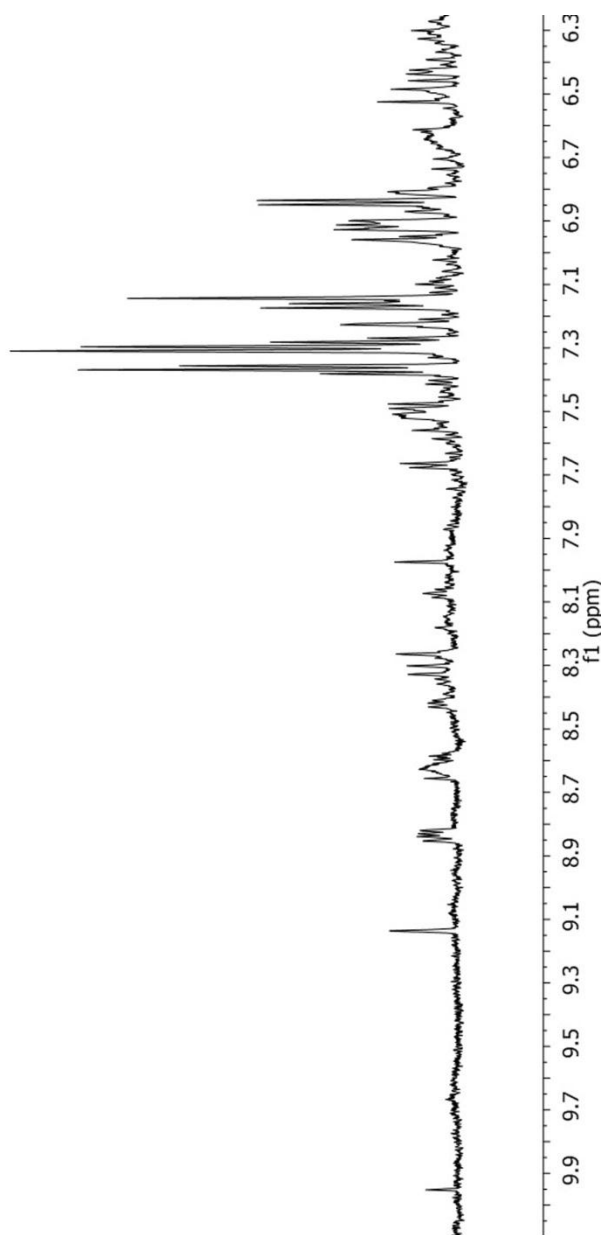
## 8.3.4. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 400 MHz para protón



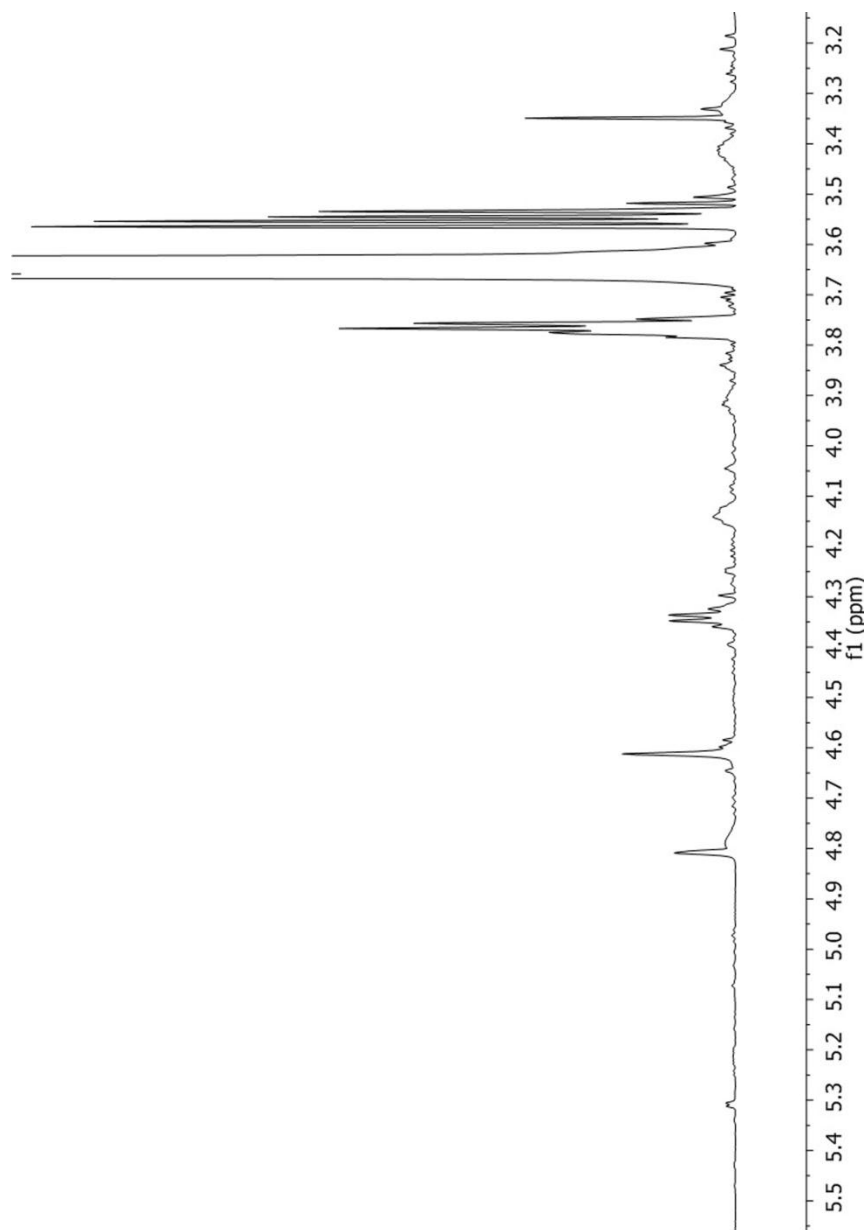
## 8.3.5. Espectro completo. 600 MHz para protón



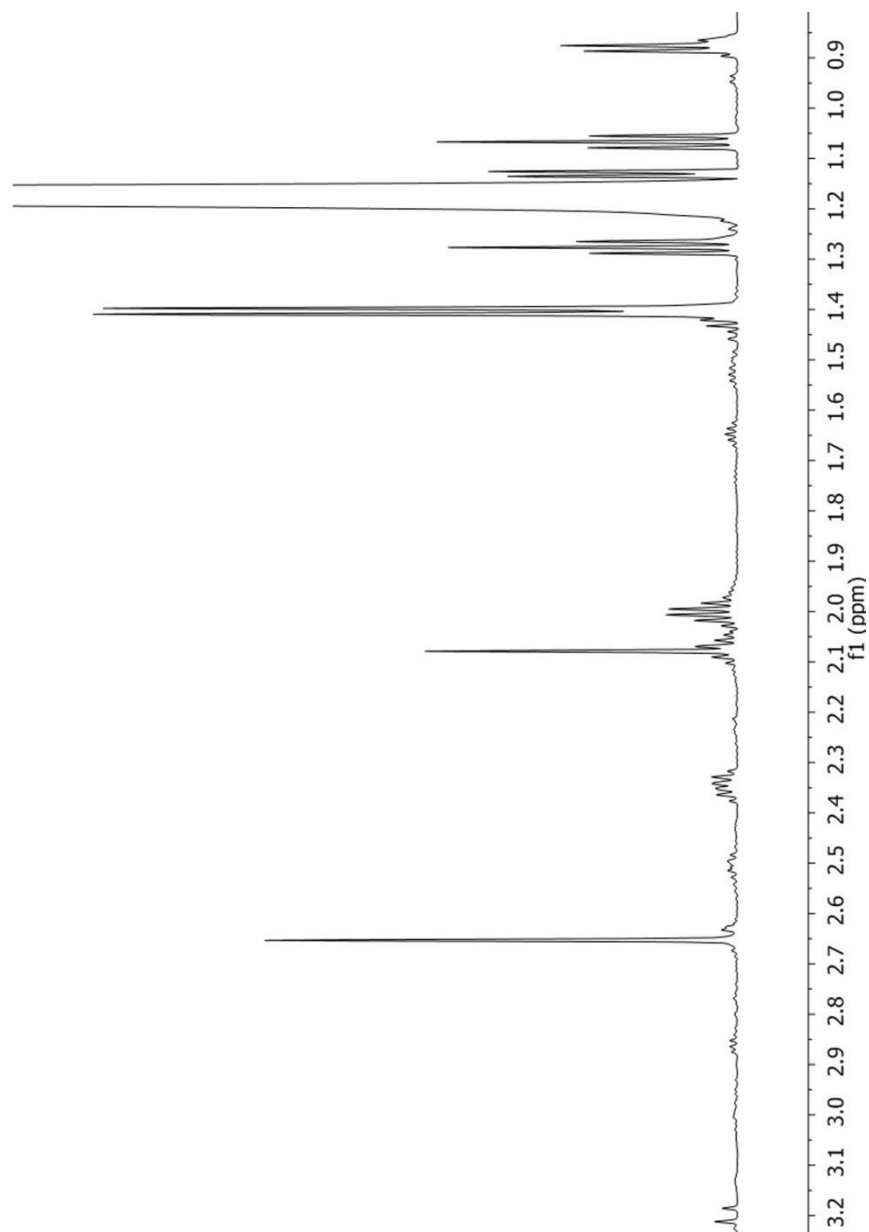
## 8.3.6. Zona de compuestos aromáticos. 600 MHz para protón



## 8.3.7. Zona de carbohidratos. 600 MHz para protón

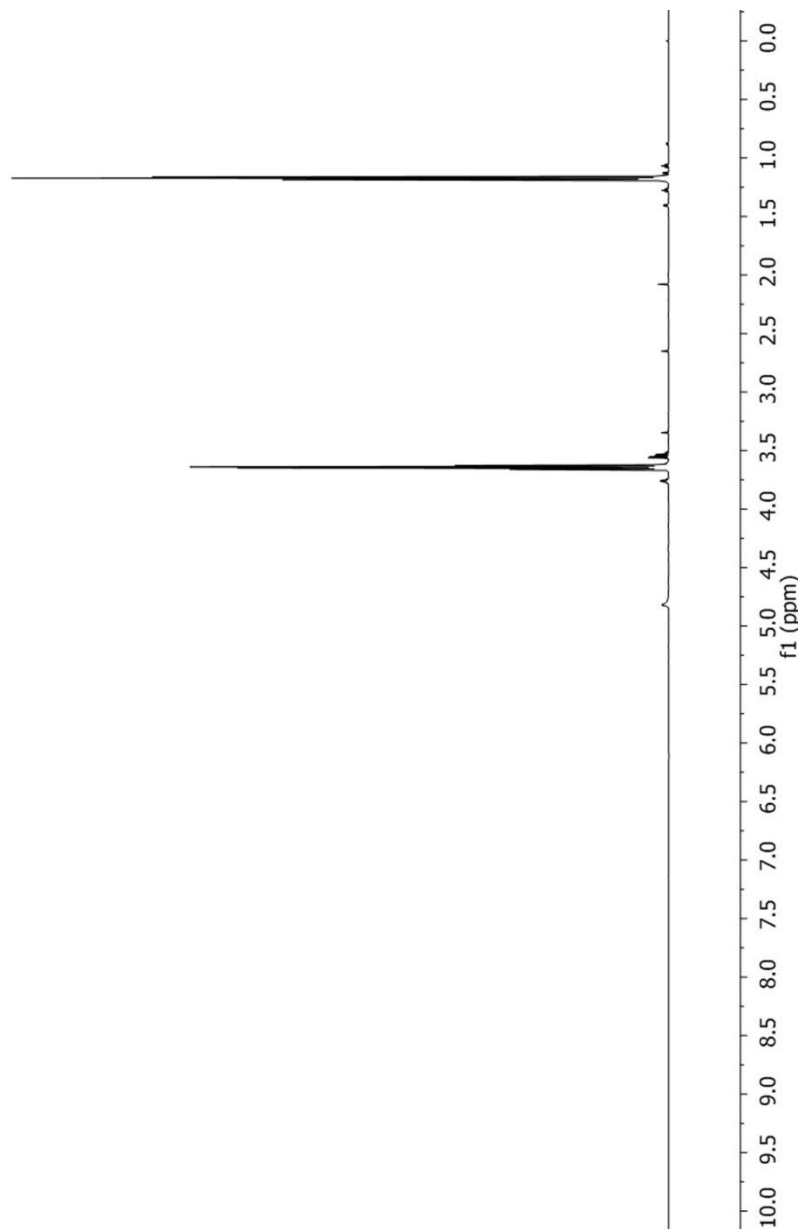


## 8.3.8. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 600 MHz para protón

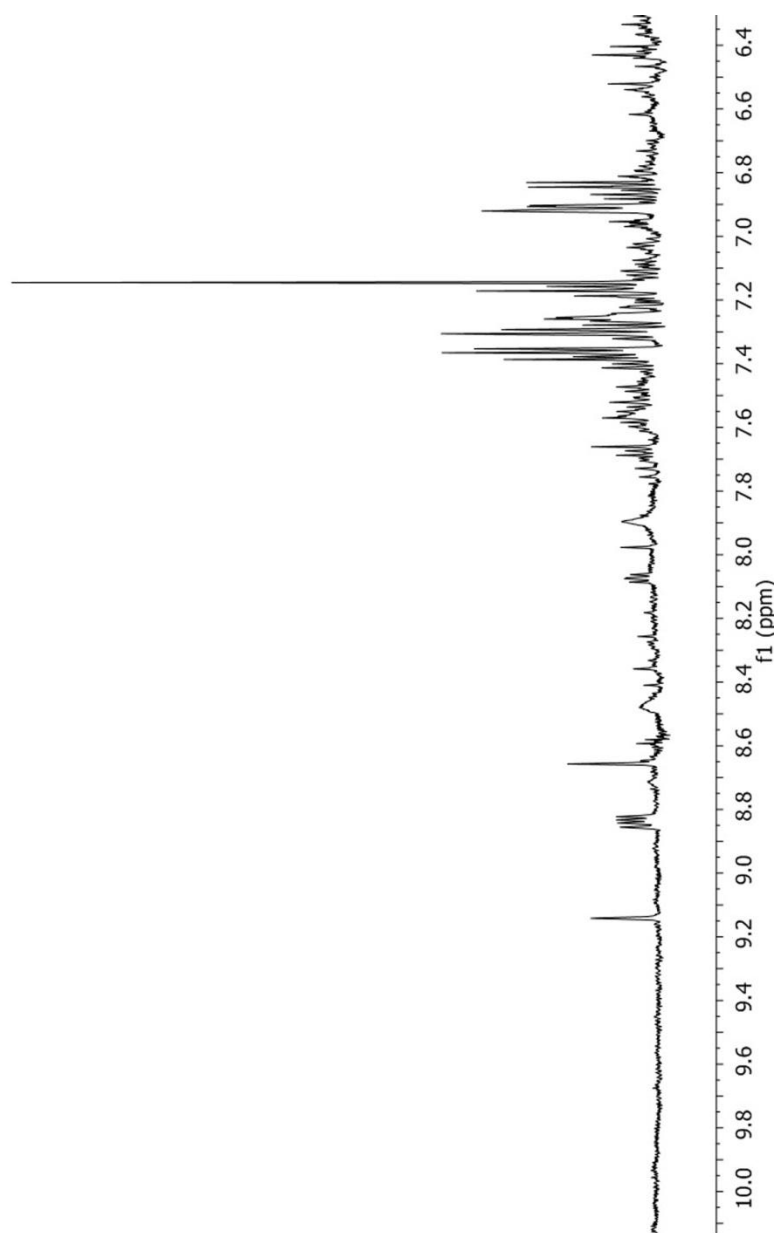


## 8.4. Espectros de RMN de protón de vino n un punto intermedio de su permanencia en barrica.

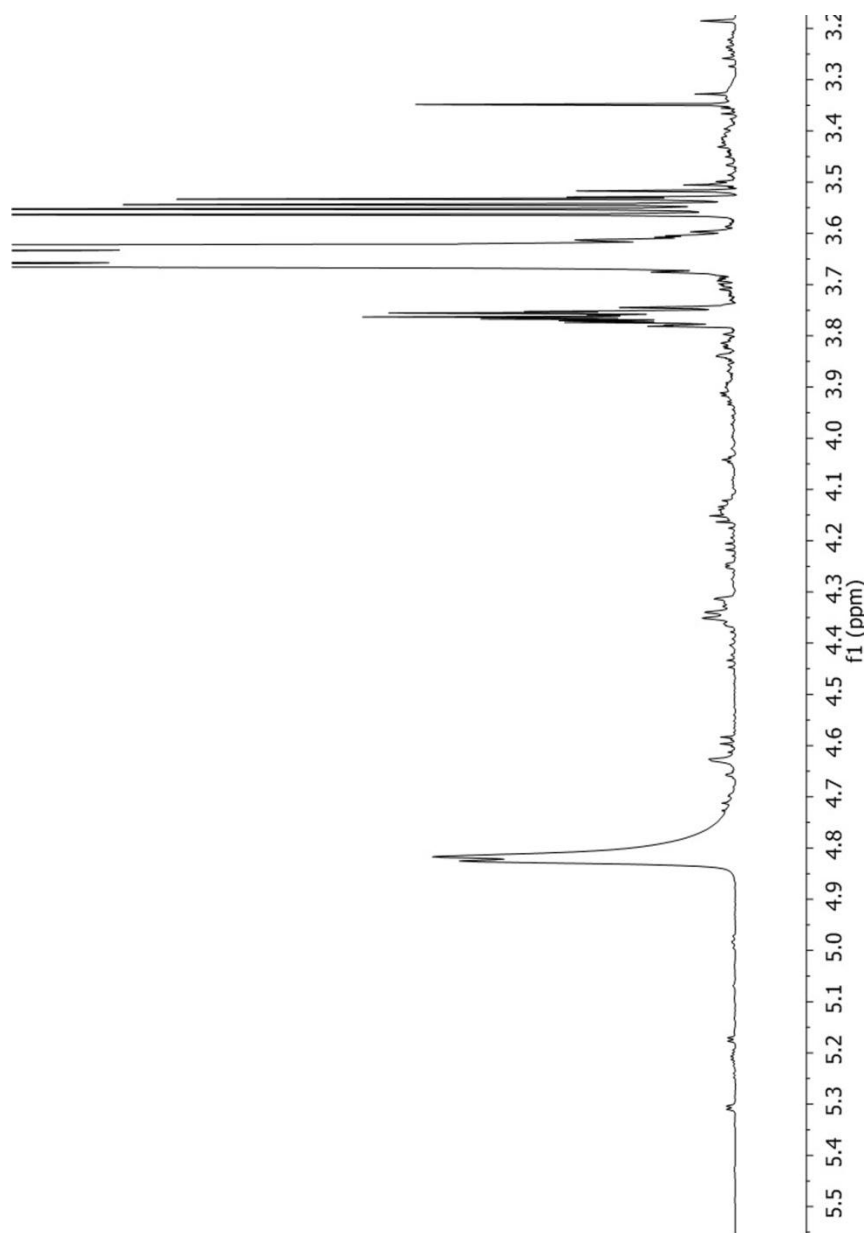
### 8.4.1. Espectro completo. 600 MHz para protón



## 8.4.2. Zona de compuestos aromáticos. 600 MHz para protón



## 8.4.3. Zona de carbohidratos. 600 MHz para protón





## 8.4.4. Zona de compuestos orgánicos (alifáticos). 600 MHz para protón

