



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA



**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

**PROGRAMA CONJUNTO DOCTORADO EN CIENCIAS
MENCION QUÍMICA**

**METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS Y AMINOÁCIDOS
DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL VINO:
APLICACIÓN DE LAS ESPECTROSCOPIAS IR-TF Y RMN EN
COMBINACIÓN CON MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Susana Mireya Restrepo Valladares

Doctora en ciencias, mención Química

2019



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA



Universidad
de Valparaíso
CHILE

**UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO**

**PROGRAMA CONJUNTO DOCTORADO EN CIENCIAS
MENCIÓN QUÍMICA**

**METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS Y AMINOÁCIDOS
DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL VINO:
APLICACIÓN DE LAS ESPECTROSCOPIAS IR-TF Y RMN EN
COMBINACIÓN CON MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

Tesis de Grado presentada por
Susana Mireya Restrepo Valladares

como requisito parcial para optar al grado de
Doctor en ciencias, mención Química

Profesor Director
Dr. Luis Espinoza Catalán

Profesora Co-Directora
Dra. Alejandra Urtubia

2019



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA



Universidad
de Valparaíso
CHILE

PROGRAMA CONJUNTO DOCTORADO EN CIENCIAS
MENCIÓN QUÍMICA

TÍTULO DE LA TESIS:

**METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN
DEL CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS Y AMINOÁCIDOS
DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DEL VINO:
APLICACIÓN DE LAS ESPECTROSCOPIAS IR-TF Y RMN EN
COMBINACIÓN CON MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.**

AUTOR:

SUSANA MIREYA RESTREPO VALLADARES

TRABAJO DE TESIS, presentado en cumplimiento parcial de los requisitos para el Grado de Doctor en Ciencias, mención Química de la Universidad Técnica Federico Santa María y de la Universidad de Valparaíso.



UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA



Comisión evaluadora:

Dra. Gabriela Lobos

(Adscrita al programa)

Universidad De Valparaíso

Dr. Héctor Carrasco

(Adscrito al programa)

Universidad Autónoma de Chile

Dr. Andrés Olea

(Adscrito al programa, área diferente
a la del profesor patrocinante)

Universidad Autónoma de Chile

Dr. Manuel Bravo

(Evaluador externo)

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Valparaíso, Chile. 2019

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Química y de Ingeniería Química de la Universidad Técnica Federico Santa María, bajo la dirección de los profesores Dr. Luis Espinoza Catalán y la Dra. Alejandra Urtubia Urbina a quienes deseo expresar mi más profundo agradecimiento por su aportación científico, tiempo y principalmente por el apoyo personal y paciencia.

La investigación desarrollada se ha financiado a través del proyecto FONDECYT N°1120679. Además de la beca interna proporcionada por UTFSM y UV durante los años 2011-2013 y 2016; de la beca Programa Incentivo a la Iniciación Científica (PIIC) durante 2012-2014. Y de la beca doctoral CONICYT en 2014-2015.

Quiero también expresar mi gratitud al Dr. Luis Rodriguez Saona, por su recibimiento y apoyo en la estadía realizada en el Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos en The Ohio State University, Columbus-Estados Unidos.

Mis más sinceros agradecimientos a mis compañeros del doctorado, laboratorio, y docentes del departamento de Química de la por UTFSM y UV quienes colaboraron al desarrollo de mi trabajo de tesis. Y un especial agradecimiento al Dr. Manuel Bravo por la formación en quimiometría, su tiempo y gran ayuda en esta tesis.

Y finalmente, pero no menos importante, deseo agradecer a mi familia y amigos que me animaron a seguir adelante y me arrancaron una sonrisa en los momentos difíciles.

Gracias

A Mario
A mi hija Julieta

ÍNDICE GENERAL

Índice.....	ii
Abreviaturas.....	vi
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	x
Resumen.....	xiii
Abstract.....	xv

INDICE

CAPÍTULO 1.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Fermentación alcohólica del vino	3
1.2 Bioquímica de la fermentación alcohólica	6
1.3 Factores importantes que influyen en la fermentación alcohólica	9
1.3.1 Factores Físicos.....	9
1.3.1.1 Temperatura	9
1.3.1.2 pH	12
1.3.2 Nutrición de la levadura	12
1.3.2.1 Compuestos nitrogenados	12
1.3.2.2 Oxígeno.....	13
1.3.3 Sustancias Inhibitorias.....	15
1.3.3.1 Etanol.....	15
1.3.3.2 Ácidos grasos de cadena media (MCFA)	16
1.4 Ácidos Grasos	16
1.5 Aminoácidos	22
1.6 Metodologías analíticas utilizadas en la fermentación alcohólica	25
1.6.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (IR-TF).....	25
1.6.2 Espectroscopía Resonancia Magnética Nuclear	27
1.7 Quimiometría	31
1.7.1 Selección del conjunto de muestras	32
1.7.2 Método de referencia.....	33
1.7.3 Obtención de la señal analítica	33
1.7.4 Pretratamiento de los datos	33
1.7.4.1 Centrado.....	33
1.7.4.3 Variable Normal Estándar (SNV, Standard Normal Variate).....	34
1.7.4.4 Derivadas	34
1.7.4.5 Corrección de Dispersión Multiplicativa (MSC, Multiplicative Scatter Correction):	35
1.7.5 Construcción del modelo	36
1.7.5.1 PLS (Mínimos Cuadrados Parciales):	36
1.7.6 Validación del modelo.....	42
1.7.7 Predicción en nuevas muestras	42
1.7.8 Ventajas y desventajas.....	43
1.7.9 Aplicaciones de la calibración multivariante.....	43
1.8 Cepa Carménère	44

CAPÍTULO 2.....	45
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
2.1 <i>Hipótesis</i>	46
2.2 <i>Objetivo general</i>	46
2.3 <i>Objetivos específicos</i>	47
CAPÍTULO 3.....	48
3. METODOLOGÍA.....	49
3. Procedimiento experimental.....	50
3.1 <i>Equipos e instrumentos</i>	50
3.2 <i>Preparación de mosto sintético</i>	51
3.3 <i>Preparación de fermentaciones con mosto real (Carmènère)</i>	51
3.4 <i>Determinación de ácidos grasos</i>	55
3.4.1 Determinación del contenido de ácidos grasos por GC-FID	55
3.4.1.1 Preparación de curva de calibración.....	56
3.4.1.2 Tratamiento de la muestra.....	56
3.4.1.3 Determinación	58
3.4.2 Determinación de ácidos grasos por IR-TF	60
3.4.2.1 Preparación de estándares	60
3.4.2.2 Tratamiento de la muestra.....	60
3.4.2.3 Determinación	61
3.5 <i>Determinación de aminoácidos</i>	62
3.5.1 Determinación del contenido de α -aminoácidos por HPLC-UV	62
3.5.1.1 Preparación de estándares	62
3.5.1.2 Tratamiento de la muestra.....	62
3.5.1.3 Determinación	64
3.5.2 Determinación de α -aminoácidos por RMN.....	66
3.5.2.1 Preparación de estándares	66
3.5.2.2 Tratamiento de la muestra.....	66
3.5.2.3 Determinación	66
3.6 <i>Desarrollo de modelos de calibración y validación.</i>	68
3.6.1 Selección del conjunto de muestras	68
3.6.2 Método de referencia.....	68
3.6.3 Obtención de la señal analítica	68
3.6.4 Métodos de preprocesamiento de datos.....	69
3.6.5 Construcción del modelo de calibración	69
3.6.6 Validación del modelo.....	70
3.6.7 Predicción en muestras desconocidas.....	70

CAPÍTULO 4.....	71
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	72
4.1 Determinación de ácidos grasos	72
4.1.1 Validación del método cromatográfico GC-FID	72
4.1.1.1 Selectividad y especificidad.....	73
4.1.1.2 Límite de detección del método	75
4.1.1.3 Límite de cuantificación del método	77
4.1.1.4 Linealidad del método	78
4.1.1.5 Precisión.....	78
4.1.1.6 Exactitud	81
4.1.1.6.1 Porcentaje de recuperación	81
4.1.2 Cuantificación de ácidos grasos por GC-FID	83
4.1.2.1 Fermentaciones normales	83
4.1.2.2 Fermentaciones problemáticas.....	88
4.1.2.3 Efecto de la temperatura en el contenido de ácidos grasos.....	99
4.1.2.4 Efecto de la aireación sobre el contenido de ácidos grasos	101
4.1.3 Determinación de ácidos grasos por IR-TF	105
4.2 Determinación de aminoácidos	106
4.2.1 Validación del método cromatográfico HPLC-UV.....	106
4.2.1.1 Límites de detección y cuantificación	108
4.2.1.2 Linealidad	110
4.2.1.3 Exactitud	110
4.2.2 Cuantificación de aminoácidos por HPLC-UV	111
4.2.2.1 Fermentaciones normales	112
4.2.3 Determinación de aminoácidos por RMN.....	117
4.3 Calibración, validación y predicción	127
4.3.1 Ácidos grasos	128
4.3.1.1 Autopredicción en mosto sintético seco	128
4.3.1.2 Autopredicción en mosto sintético húmedo.....	129
4.3.1.3 Calibración y validación en mosto real seco (Fermentaciones normales).....	131
4.3.1.4 Calibración y validación en mosto real húmedo (Fermentaciones normales).....	132
4.3.1.5 Otras estrategias evaluadas	133
4.3.2 Aminoácidos	141
4.3.2.1 Autopredicción de aminoácidos en mostos reales (Fermentaciones normales).....	141
CAPÍTULO 5.....	143
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	144

CAPÍTULO 6.....	147
6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	148
CAPÍTULO 7.....	149
7. BIBLIOGRAFÍA	150
ANEXOS.....	161
<i>Anexo 1. Protocolo de fermentación.</i>	162
<i>Anexo 2. Espectros de ¹H RMN, elucidación estructural de estándares de aminoácidos.</i>	178
<i>Anexo 3. Espectros de ¹³C RMN, elucidación estructural de estándares de aminoácidos.</i>	183
<i>Anexo 4. Espectros de ¹H RMN (con y sin supresión de disolvente) y espectros de ¹³C RMN de mostos en fermentación (cepa <i>Carménère</i>).</i>	188
<i>Anexo 5. Espectros de ¹H RMN de aminoácidos comparados con las muestras de mosto en fermentación.</i>	210

ABREVIATURAS

ATR	Reflectancia Total Atenuada
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
Co-shifting	Correlation Optimized shifting
COW	Correlation Optimized Warping
¹³ C RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
CV	Coefficiente de variación
CV _h	Coefficiente de variación de Horwitz
EMMDE	Etoximetilmalonato de dietilo
FAN	Nitrógeno fácilmente asimilable
FAMEs	Metil ésteres de ácidos grasos
GC-FID	Cromatografía gaseosa acoplada a un detector de ionización de llama
HPLC-UV	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a un detector Ultravioleta
¹ H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
icoshift	Interval-correlation-shifting
IR-TF	Infrarrojo con Transformada de Fourier
IS	Estándar interno
KS	Kennard-Stone
LCUFA	Ácidos grasos de cadena larga insaturados
LDA	Análisis Lineal Discriminante
LDM	Límite de detección del método
LQM	Límite de cuantificación del método
MCFA	Ácidos grasos de cadena media
MIR	Infrarrojo Medio
MSC	Multiplicative Scatter Correction
MVC1	Calibración multivariada de primer orden
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido
NIPALS	Mínimos cuadrados parciales iterativos no lineales
NIR	Infrarrojo Cercano
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Regresión de Componentes Principales
PLS	Mínimos cuadrados parciales
PRESS	Relative Standard Error
PVDF	Polivinil Difluoruro
qHNMR	Resonancia Magnética Nuclear de protón cuantitativa
RSE	Sum of Squares Prediction Error
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
RMSE	Root Mean Square Error
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico

TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TPS	Trimetilsilyl propionato
t_r	Tiempo de retención
SD	Desviación estándar
SNV	Variable normal estándar

Índice de Tablas

Tabla 1: Porcentaje de ácidos grasos en tres especies de levadura, a dos diferentes temperaturas de fermentación ¹⁴	11
Tabla 2: Asimilación de compuestos nitrogenados por <i>S. cerevisiae</i> ^{19,20}	12
Tabla 3: Estructuras químicas de ácidos grasos metilados saturados ²⁷	17
Tabla 4: Estructuras químicas de ácidos grasos metilados insaturados ²⁷	18
Tabla 5: Continuación estructuras químicas de ácidos grasos metilados insaturados ²⁷	19
Tabla 6: Concentración (mg/L) de ácidos grasos en mosto y vino ²⁶	20
Tabla 7: Concentración (mol %) de ácidos grasos en vinos rojos comerciales ²⁹	21
Tabla 8: Estructuras α -aminoácidos ²⁷	22
Tabla 9: Rangos de concentración (mg/L) de α -aminoácidos en vinos rojos ³²	23
Tabla 10: Concentraciones (mg/L) de α -aminoácidos en mosto Viura ²⁸	24
Tabla 11: Ventajas y desventajas de las técnicas IR-TF(NIR) e IR-TF(MIR) ^{43,50}	27
Tabla 12: Concentraciones (mg/L) en mosto sintético ⁷⁶	52
Tabla 13: Condiciones de operación para las fermentaciones del vino <i>Carménère</i>	54
Tabla 14: Diseño de experimentos: Nivel carencia (-1), nivel normal (0), nivel exceso (1).....	55
Tabla 15: Condiciones cromatográficas para método GC-FID.....	59
Tabla 16: Soluciones de ácidos grasos para la determinación de rango lineal.....	60
Tabla 17: Condiciones cromatográficas para HPLC-UV ⁸³	64
Tabla 18: Programa de elución del método en HPLC-UV.....	65
Tabla 19: Resultados de algunas cifras de mérito. La linealidad (cinco niveles de concentración), coeficiente de determinación (R^2), límites de detección y cuantificación del método de una mezcla de FAMES de 37 componentes.....	77
Tabla 20: Resultados de repetitividad con cinco réplicas de muestra.....	79
Tabla 21: Resultados de la validación del método. Exactitud (Porcentajes de recuperación).....	82
Tabla 22: Resultados de la cuantificación por GC-FID en fermentaciones normales: Concentraciones (mg/L) de MCFA (C _{6:0} , C _{8:0} , C _{10:0} y C _{12:0}) y LCUFA (C _{14:1} , C _{16:1} , C _{18:1} , C _{18:2} y C _{18:3}) en siete fermentaciones alcohólicas del vino <i>Carménère</i>	84
Tabla 23: Resultados de la cuantificación por GC-FID en fermentaciones problemáticas: Concentraciones (mg/L) de MCFA (C _{6:0} , C _{8:0} , C _{10:0} y C _{12:0}) y LCUFA (C _{14:1} , C _{16:1} , C _{18:1} , C _{18:2} y C _{18:3}) en diecinueve fermentaciones problemáticas alcohólicas del vino <i>Carménère</i>	88
Tabla 24: Fermentaciones agrupadas por efectos (24, 28 y 32 °C, anaeróbica, aireación inicial, aireación al inicio y final de la fase exponencial). Concentraciones (mg/L) de MCFA y LCUFA y la relación MCFA/LCUFA en la fermentación alcohólica del vino <i>Carménère</i>	97
Tabla 25: Límites de detección y cuantificación del método en mg/L ⁸⁴	108
Tabla 26: Resultados de la calibración del método cromatográfico. Intervalos de concentración (mg/L), intercepto, pendiente de la recta y coeficiente de determinación para cada aminoácido ⁸⁴	110
Tabla 27: Resultados de la calibración del método cromatográfico. Intervalos de concentración (mg/L), intercepto, pendiente de la recta y coeficiente de determinación para cada aminoácido.....	111

Tabla 28: Concentraciones (mg/L) de aminoácidos (Ácido glutámico, glutamina, alanina, arginina) en ocho fermentaciones alcohólicas del vino <i>Carménère</i> ¹⁰⁴	113
Tabla 29: Datos espectroscópicos de ¹ H RMN ²⁷	120
Tabla 30: Autopredicción del mosto sintético seco por IR-TF.	128
Tabla 31: Autopredicción del mosto sintético húmedo por IR-TF.....	129
Tabla 32: Mosto real seco (Fermentaciones normales), Cal[75%] y Val[25%].	131
Tabla 33: Mosto real húmedo (Fermentaciones normales), Cal[75%] y Val[25%].....	132
Tabla 34: Mosto sintético seco [Cal] y Mosto real seco (fermentaciones normales) [Val y Pred].....	134
Tabla 35: Predicciones de ácidos grasos saturados en muestras reales secas (Fermentaciones normales).....	135
Tabla 36: Predicciones de ácidos grasos insaturados en muestras reales secas (Fermentaciones normales).....	136
Tabla 37: Autopredicción con mosto sintético húmedo y mosto real húmedo(Fermentaciones normales y problemáticas).....	137
Tabla 38: Mosto sintético húmedo y mosto real húmedo (Fermentaciones normales) [cal75%] y mosto real húmedo (Fermentaciones problemáticas) [val 25%].....	139
Tabla 39: Modelos con <i>Kennard-Stone</i>	140
Tabla 40: Predicción para el C _{12:0} del modelo con <i>Kennard-Stone</i>	140
Tabla 41: Autopredicción de aminoácidos en mostos reales (F.normales).....	141

Índice de Figuras

Figura 1: Fases del crecimiento microbiano de la levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> ⁵	5
Figura 2: Vías metabólicas de levadura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> y sustancias generadas ⁹	8
Figura 3: Formación de compuestos en la levadura ⁹	9
Figura 4: Biosíntesis de los ácidos grasos por la levadura <i>S. cerevisiae</i> ⁷	20
Figura 5: Espectro ¹ H RMN (400 MHz) de un mosto en fermentación ⁵⁷	30
Figura 6: Construcción de matrices X y Y	32
Figura 7: PRESS versus A	41
Figura 8: Esquema de metodologías utilizadas	50
Figura 9: Fermentadores de 4 litros (escala de laboratorio)	53
Figura 10: Mecanismo de reacción: Saponificación de un éster ²⁷	57
Figura 11: Mecanismo de reacción: Esterificación de Fisher. (1) Adición del alcohol al grupo carbonilo catalizada por un ácido. (2) Deshidratación catalizada por un ácido ²⁷	58
Figura 12: Esquema del procedimiento de cuantificación de ácidos grasos por GC-FID	59
Figura 13: Esquema del procedimiento de determinación de ácidos grasos por IR-TF	61
Figura 14: Reacción de derivatización esquemática para un aminoácido primario	63
Figura 15: Mecanismo de reacción: Adición 1,4 (Adición de Michael)	63
Figura 16: Esquema del procedimiento de cuantificación de aminoácidos por HPLC-UV	65
Figura 17: Esquema del procedimiento de determinación de aminoácidos por RMN	67
Figura 18: Identificación de ácidos grasos: Cromatograma del mix 37 componentes de FAMES por GC-FID. *t _r =6,324 min (C _{6:0} caproico), t _r =9,068 (C _{8:0} caprílico), t _r =10,383 (C _{9:0} Estándar interno), t _r =11,582 (C _{10:0} cáprico), t _r =13,847 (C _{12:0} laúrico), t _r =16,274 (C _{14:1} miristoleico), t _r =18,039 (C _{16:1} palmitoleico), t _r =19,732 (C _{18:1} oleico), t _r =20,116 (C _{18:2} linoléico), t _r =20,378+20,661 (C _{18:3} linolénico). * t _r : Tiempo de Retención	74
Figura 19: Trompeta de Horwitz, muestra la relación inversa entre la concentración del analito y la desviación estándar relativa. (Imagen tomada de: http://www.chromatographyonline.com/know-your-sample-size-matters-0)	81
Figura 20: (A) Promedio del perfil de densidad a diferentes temperaturas 24, 28 y 32°C. (B) Promedio del perfil de densidad con diferentes estrategias de aireación: Aireación inicial, anaeróbica y, aireación al inicio y final de la fase exponencial	94
Figura 21: (A) Promedio del perfil de biomasa (cell/mL) a diferentes temperaturas 24, 28 y 32°C. (B) Promedio del perfil de biomasa (cell/mL) con diferentes estrategias de aireación: Aireación inicial, anaeróbica y, aireación al inicio y final de la fase exponencial. En ambas gráficas se representa la curva de crecimiento (F1-F7) de la <i>Saccharomyces cerevisiae</i> normalizada con el modelo Gompertz (A=2,23; μ=0,29; e=3, λ=12) ⁹⁸	96
Figura 22: Relación MCFA/LCUFA para todos los tratamientos de temperatura y aireación	98
Figura 23: (A) Perfil de MCFA en fermentaciones a 24 °C. (B) Perfil de MCFA en fermentaciones a 28 °C. (C) Perfil de MCFA en fermentaciones a 32 °C. (D) Perfil de LCUFA en fermentaciones a 24 °C. (E) Perfil de LCUFA en fermentaciones a 28 °C. (F) Perfil de LCUFA en fermentaciones a 32 °C	100

Figura 24: (A) Perfil de MCFA en fermentaciones anaeróbicas. (B) Perfil de MCFA en fermentaciones normales con aireación inicial. (C) Perfil de MCFA con aireación inicial y al final de la fase exponencial. (D) Perfil de LCUFA en fermentaciones anaeróbicas. (E) Perfil de LCUFA en fermentaciones normales con aireación inicial. (F) Perfil de LCUFA con aireación inicial y al final de la fase exponencial.	103
Figura 25: Espectros de absorción molecular de mosto en fermentación real (cepa <i>Carménère</i>) tomado cada 12 horas a escala de laboratorio bajo condiciones normales de operación. Muestra húmeda.	107
Figura 26: Identificación de aminoácidos: Cromatograma de una matriz de mosto <i>Carménère</i> (rojo) comparada con una matriz de mosto con adición de kit de 18 aminoácidos (azul). Medido a 280 nm con un detector UV: (1) Acido aspártico, (2) Acido glutámico, (IS) Estándar interno, (3) Asparagina+Serina, (4) glutamina, (5) histidina, (6) glicina, (7) treonina, (8) arginina, (9) alanina, (10) Prolina, (11) tirosina, (12) ión amonio, (13) valina, (14) metionina, (15) cisteína, (16) isoleucina, (17) leucina+triptofano, (18) fenilalanina ⁸⁴	109
Figura 27: Perfil de biomasa de ocho fermentaciones alcohólicas.	112
Figura 28: Perfil de concentración (mg/L) del ácido glutámico en ocho fermentaciones alcohólicas del vino <i>Carménère</i>	115
Figura 29: Perfil de concentración (mg/L) de alanina en ocho fermentaciones alcohólicas del vino <i>Carménère</i>	115
Figura 30: Perfil de concentración (mg/L) de arginina en ocho fermentaciones alcohólicas del vino <i>Carménère</i>	116
Figura 31: Perfil de concentración (mg/L) de glutamina en ocho fermentaciones alcohólicas del vino <i>Carménère</i>	116
Figura 32: Espectros de ¹ H RMN sin supresión de disolvente, sin filtrar y con TSP..	118
Figura 33: Espectros de ¹ H RMN con supresión de disolvente, filtrada y con TSP....	119
Figura 34: Espectros de ¹ H RMN de aminoácidos en D ₂ O superpuestos con una muestra (F5) de la fermentación alcohólica del vino a t=0 h.	121
Figura 35: Espectros de ¹ H RMN de aminoácidos en D ₂ O superpuestos con una muestra (F5) de la fermentación alcohólica del vino a t=48 h.	122
Figura 36: Espectro de ¹ H RMN del estándar de prolina en D ₂ O con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 t=48 h.	123
Figura 37: Espectro de ¹ H RMN del estándar de alanina en D ₂ O con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 t=48 h.	124
Figura 38: Espectros de ¹ H RMN de aminoácidos en D ₂ O superpuestos con una muestra (F5) de la fermentación alcohólica del vino a t=96 h.	125
Figura 39: Espectro de ¹ H RMN alanina con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 t=96 h.	126
Figura 40: Espectro de ¹ H RMN del estándar prolina en D ₂ O con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 t=96 h.	127
Figura 41: Comparación de espectros de muestra seca y muestra húmeda.	130

Resumen

La fermentación alcohólica del vino es un proceso anaeróbico altamente complejo por su gran número de compuestos y reacciones bioquímicas involucradas. Debido a los múltiples factores que influyen en el transcurso de la fermentación, existe una gran variabilidad en el contenido de α -aminoácidos, ácidos grasos de cadena media (MCFA) y ácidos grasos de cadena larga insaturados (LCUFA). Por esta razón, es deseable conocer las concentraciones de estas sustancias ya que pueden ser variables críticas que no son consideradas durante el monitoreo de la fermentación.

El contenido de ácidos grasos y α -aminoácidos no se determinan rutinariamente debido a que la cuantificación es realizada por cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) respectivamente, involucrando tratamientos de muestra muy largos, análisis costosos y poco amigables con el medio ambiente. De aquí, nace la necesidad de desarrollar métodos alternativos eficientes y confiables que permitan conocer el contenido de estas sustancias.

En la presente tesis se desarrollaron dos nuevas metodologías analíticas para la cuantificación de diversos componentes en la fermentación alcohólica del vino de la cepa *Carménère*. Para ello se emplearon distintas técnicas cromatográficas y espectroscópicas, con el objetivo de cuantificar MCFA, LCUFA y aminoácidos.

Se desarrolló y validó la metodología analítica por GC-FID, para la identificación y cuantificación del contenido de MCFA como C_{6:0} (~ 0,61-47,55 mg/L), C_{8:0} (~ 0,56-87,59 mg/L), C_{10:0} (~ 0,39-84,73 mg/L), C_{12:0} (~ 0,32-8,75 mg/L) y LCUFA como C_{14:1} (~ 0,54-9,91 mg/L), C_{16:1} (~ 0,51-45,78 mg/L), C_{18:1} (~ 0,44-26,96 mg/L), C_{18:2} (~ 0,50-62,17 mg/L), C_{18:3} (~ 0,46-25,24 mg/L) en mostos de fermentaciones normales y problemáticas.

La determinación de estos compuestos en mostos en fermentación involucró dos pasos: la preparación de los metil ésteres de ácidos grasos por derivatización con BF₃ y el análisis por GC-FID. Para algunos analitos, se encontraron por debajo de los límites de cuantificación del método.

Por otro parte, se pudo identificar los MCFA y LCUFA mediante espectroscopia IR-TF en el rango medio (MIR) para mosto sintético y mosto real que incluye fermentaciones normales y problemáticas. Se evaluó dos formas de toma de muestra (seca y húmeda), las cuales no tuvieron diferencia en la información espectral entregada.

Se desarrollaron los modelos de calibración y validación con la herramienta quimiométrica PLS, basados en determinaciones por IR-TF y GC-FID. Se aplicaron diferentes pretratamientos espectrales, que permitieron corregir efectos indeseados en los espectros. Los modelos desarrollados con mosto sintético en su forma húmeda y seca cumplieron los criterios de aceptación logrando una buena capacidad predictiva, con RMSEP (<12%) y R^2 por encima de 0,990; mientras que, en muestras reales los modelos no fueron aceptables debido a la alta variabilidad en los valores de referencia.

Se logró implementar y validar la metodología analítica por HPLC, en la modalidad de fase reversa y detección directa al UV a 280 nm, para la identificación y cuantificación de α -aminoácidos como ácido L-glutámico (~64,5-473,6 mg/L), L-arginina (~9,9-115,4 mg/L), DL-alanina (~3,7-104,9 mg/L), L-glutamina (~7,2-125,2 mg/L) en mostos de fermentaciones normales. No se pudo cuantificar la L-prolina. Se requirió un tratamiento previo de la muestra, derivatización con EMMDE.

Se identificaron los α -aminoácidos (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina y L-prolina) mediante espectroscopia RMN de alta resolución de estándares de referencia, y se verificó la presencia de alanina y prolina en mostos de fermentaciones normales con la aplicación de la técnica TOCSY.

Se desarrollaron modelos de calibración y validación con PLS, basados en determinaciones por RMN y HPLC-UV en mosto de fermentaciones normales. Los aminoácidos tuvieron errores de predicción muy por encima de lo esperado, excepto para la glutamina que tuvo RMSEP de 18,7% y R^2 de 0,305.

Abstract

The alcoholic fermentation of wine is a highly complex anaerobic process due to its large number of compounds and biochemical reactions involved. Due to the multiple factors that influence the course of the fermentation, there is a great variability in the content of α -amino acids, medium chain fatty acids (MCFA) and long chain unsaturated fatty acids (LCUFA). For this reason, it is desirable to know the concentrations of these substances since they can be critical variables that are not considered during the monitoring of the fermentation.

The content of fatty acids and α -amino acids are not determined routinely because the quantification are performed by gas chromatography (GC) and high efficiency liquid chromatography (HPLC) respectively, involving very long sample treatments, costly and unfriendly analyzes with environment. Hence, the need arises to develop efficient and reliable alternative methods that allow knowing the content of these substances.

In this thesis, two new analytical methodologies for quantification of several components of *Carménère* wine alcoholic fermentation were developed and evaluated. Specifically, for determination of MCFA, LCUFA and amino acids, chromatographic and spectroscopic techniques were used.

Analytical methodology by GC-FID was implemented and validated for identification and quantification of MCFA content as C_{6:0} (~ 0,61-47,55 mg/L), C_{8:0} (~ 0,56-87,59 mg/L), C_{10:0} (~ 0,39-84,73 mg/L), C_{12:0} (~ 0,32-8,75 mg/L) and LCUFA as C_{14:1} (~ 0,54-9,91 mg/L), C_{16:1} (~ 0,51-45,78 mg/L), C_{18:1} (~ 0,44-26,96 mg/L), C_{18:2} (~ 0,50-62,17 mg/L), C_{18:3} (~ 0,46-25,24 mg/L) in musts of normal and problematic fermentations.

Determination of these compounds in fermentation involved two steps: preparation of methyl ester of fatty acids (FAMES) by derivatization with BF₃, and the analysis by GC-FID. Some analytes were below the limits of method quantification.

Additionally, unsaturated medium chain and long chain fatty acids were identified by FTIR spectroscopy in the middle range (MIR), for normal and problem fermentations and

with artificial and real must. Dry and wet sampling were tested, none differences in the spectral information were found.

Using the FTIR and GC-FID measurements, calibration and validation models with PLS chemometric tool were developed. Different spectral pre-treatments were applied, which allowed to correct undesired effects in the spectra. All the models for artificial must (wet and dry) reached the acceptance criteria with good predictive capacity, RMSEP <12% and R^2 above 0,990, while in real must the models were not acceptable due to the great variability in the reference values.

Analytical methodology by HPLC in reverse phase modality and direct UV detection at 280 nm, was implemented and validated for identification and quantification of α -amino acids L-glutamic acid (~ 64,5-473,6 mg/L), L-arginine (~ 9,9-115,4 mg/L), DL-alanine (~ 3,7-104,9 mg/L), L-glutamine (~ 7,2-125,2 mg/L) in musts of normal fermentations. The L-proline could not be quantified. A sample pre-treatment and derivatization with EMMDE were required.

The α -amino acids (L-glutamic acid, L-arginine, DL-alanine, L-glutamine and L-proline) were identified by high resolution NMR spectroscopy of reference standards. Alanine and proline in normal fermentation musts were detected with the application of TOCSY technique.

Using the NMR and HPLC-UV measurements in normal fermentations, calibration and validation models with PLS were developed. Prediction errors were higher than expected, except for glutamine with RMSEP of 18,7% and R^2 of 0,305.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación alcohólica del vino es un proceso anaeróbico altamente complejo por su gran número de compuestos y reacciones bioquímicas involucradas, lo que implica interacciones positivas o negativas entre ellos, con el medio, los microorganismos y las condiciones de operación. El desarrollo de la fermentación alcohólica, y en consecuencia la calidad del vino resultante, está condicionada por factores físicos (temperatura, pH, agitación, etc), nutrición de la levadura (compuestos nitrogenados, oxígeno) y sustancias inhibitorias (etanol, ácidos grasos de cadena media). Cada uno de estos factores influye en el contenido de sustancias tales como los α -aminoácidos, ácidos grasos de cadena media (MCFA) y ácidos grasos de cadena larga insaturados (LCUFA), generando un aumento o disminución de sus concentraciones de las cuales pueden afectar el óptimo desarrollo de la fermentación.

Dado que existe una gran variabilidad en las concentraciones de α -aminoácidos y ácidos grasos de cadena media (tóxicos para la levadura) y cadena larga insaturados (factores de supervivencia) y debido a los múltiples factores que influyen en el transcurso de la fermentación alcohólica, es deseable conocer las concentraciones de estas sustancias por el rol importante que juegan durante el proceso, ya que éstas pueden ser variables críticas que no son consideradas durante el monitoreo de la fermentación alcohólica del vino.

Comúnmente las variables estándar que se monitorean durante una fermentación son °Brix, densidad, alcohol, pH, temperatura, acidez total y volátil, entre otras, mínimas y necesarias para conocer el estado de una fermentación. El contenido de α -aminoácidos y ácidos grasos no se determinan rutinariamente debido a que la cuantificación de estas sustancias se realizan por cromatografía gaseosa (GC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), involucrando tratamientos de muestra muy largos, análisis costosos y poco amigables con el medio ambiente, de aquí nace la necesidad de desarrollar métodos analíticos alternativos de manera eficiente y exactos que permitan conocer el contenido de α -aminoácidos y ácidos grasos durante la fermentación alcohólica del vino.

La cuantificación del contenido de ácidos grasos ($C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:1}$, $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$) por IR-TF (Infrarrojo con Transformada de Fourier) y α -aminoácidos (Ac. glutámico, arginina, alanina, glutamina y prolina) por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) durante la fermentación alcohólica del vino combinados con métodos quimiométricos no ha sido evaluada ni reportada hasta el momento en la literatura. Otro aspecto por destacar es que la evolución de los ácidos grasos y α -aminoácidos nunca ha sido estudiada bajo la influencia de diferentes temperaturas y oxigenaciones en la fermentación alcohólica de la cepa *Carménère*.

Esta investigación propone demostrar las posibilidades de la espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier y Resonancia Magnética Nuclear en combinación con calibración multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) como herramienta cuantitativa, desarrollando metodologías analíticas basadas en medidas de absorbancias e intensidades respectivamente, adecuadas para poder evaluar los compuestos de interés de una muestra compleja como es la fermentación del vino.

1.1 Fermentación alcohólica del vino

Una de las principales etapas del proceso de vinificación es la fermentación. Existen diferentes tipos como la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica.

La fermentación alcohólica del vino es donde se da la conversión de los principales azúcares de la uva; glucosa y fructosa a etanol y dióxido de carbono, ésta es conducida por las levaduras del género *Saccharomyces*, generalmente por la *S. cerevisiae* y *S. bayanus*; y la fermentación maloláctica es donde se da la conversión del ácido málico al ácido láctico por la acción de la bacteria ácido láctica¹.

Esta tesis, se centra en la fermentación alcohólica debido a que es un proceso altamente complejo por su gran número de compuestos y reacciones bioquímicas involucradas, lo que implica interacciones positivas o negativas entre ellos con el medio, los microorganismos y las condiciones de operación.

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico de transformación de los azúcares del mosto en alcohol, a lo largo de una serie de reacciones en cadena catalizadas por las enzimas contenidas en el citoplasma de las levaduras.

Al denominar a una fermentación como “alcohólica” se está limitando a las fermentaciones que tienen como objetivo principal producir alcohol, etanol fundamentalmente, podría resumirse desde un punto de vista práctico algunos de los componentes involucrados en una fermentación:

Mosto de uva: Es un sustrato complejo que proviene de la uva y contiene principalmente agua, azúcares (glucosa, fructosa), compuestos nitrogenados, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos aromáticos, minerales y sustancias pécticas².

Levadura: El microorganismo más utilizado es *Saccharomyces cerevisiae* (hongo unicelular)³, responsable de transformar los azúcares en etanol.

Productos: Etanol más CO₂; y como subproductos generados por diferentes vías metabólicas: Alcoholes superiores, ácidos orgánicos (acético, cítrico, láctico, succínico, málico, tartárico), ácidos grasos (cadena corta, media y larga), α -aminoácidos, flavonoides, terpenos, ésteres, aldehídos, cetonas entre muchos otros compuestos.

Energía: El metabolismo celular se puede considerar como una reacción exotérmica.

La energía libre de Gibbs de la reacción de fermentación etílica muestra un valor de ΔG -234,6 kJ mol⁻¹, este valor negativo de la energía libre de Gibbs indica que desde el punto de vista termodinámico la fermentación etílica es un proceso químico espontáneo.

El desarrollo del microorganismo (levadura) en la fermentación alcohólica presenta cuatro fases específicas que se describen a continuación⁴:

Fase de latencia: Se trata de una fase en la que no hay proliferación del microorganismo, sin embargo, la actividad celular está presente en el acondicionamiento del medio

intracelular para la proliferación en el nuevo ambiente. Se encuentra caracterizada por un tiempo de retraso o latencia.

Fase exponencial: Aquí es cuando las células se empiezan a replicar y la actividad celular se vuelve intensa, cambiando en varios ordenes de magnitud la población de microorganismos, en esta fase el parámetro característico es la tasa máxima de crecimiento de la biomasa.

Fase estacionaria: En esta fase se estanca el desarrollo de la biomasa, sin embargo, se mantiene la actividad celular debido al equilibrio entre el crecimiento celular y el deceso de las células.

Fase de muerte celular: En esta fase final, se agotan las fuentes de energía y la tasa de muerte celular supera a la de crecimiento, en consecuencia, el número de células descende, como se observa en la *Figura 1*.

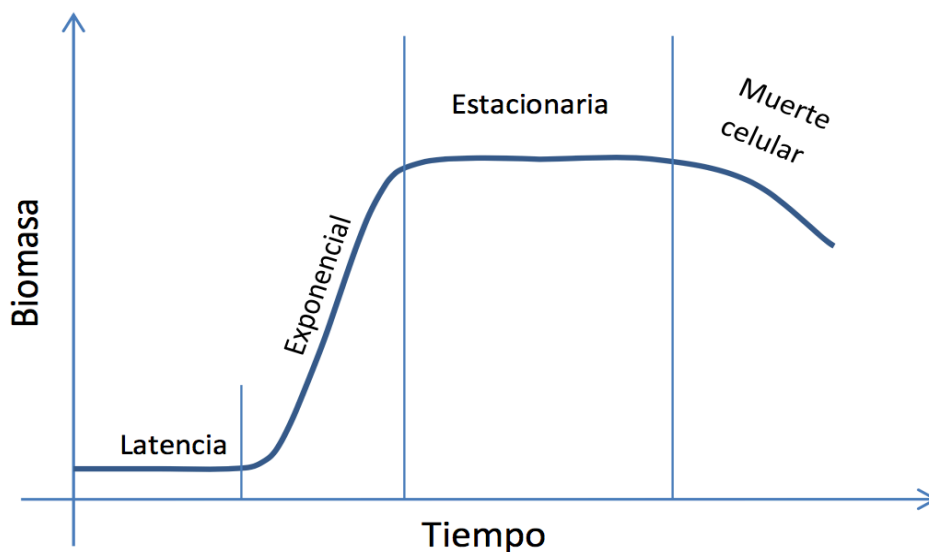


Figura 1: Fases del crecimiento microbiano de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae*⁵.

La carga enzimática de las distintas especies de levaduras presenta diversidad cualitativa y cuantitativa, incluso entre las diferentes cepas o variedades. Por lo tanto, el curso de la fermentación puede ser diferente en función de las características fisiológicas de la levadura, las características fisicoquímicas del sustrato y las condiciones ambientales en que se desarrolle, que influirán en la producción y funcionalidad de las enzimas presentes. Además del etanol y CO₂, como resultado de la fermentación, se originan otros subproductos (antocianinas responsables del color; los azúcares, los ácidos, los ésteres y los polifenoles responsables del sabor y aroma, entre otros compuestos) fundamentales para las cualidades organolépticas del vino¹.

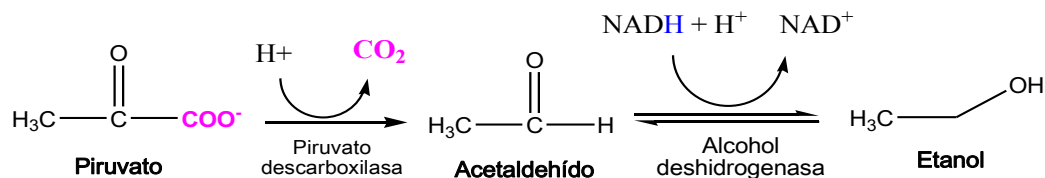
1.2 Bioquímica de la fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica se pueden distinguir dos etapas:

En una primera etapa, las levaduras degradan algunas moléculas de azúcar por vía respiratoria: El metabolismo sigue la ruta de la glicólisis (consiste en diez reacciones enzimáticas consecutivas que convierten a la glucosa en dos moléculas de piruvato), esta ruta se denomina Embden-Meyerhof. Posteriormente, el piruvato que a su vez es descarboxilado por la enzima piruvato deshidrogenasa que genera acetil-CoA.

El acetil-CoA (Acetil Coenzima A) es el principal precursor del ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) como se puede observar en la *Figura 2*, con una elevada producción de energía, que permite una rápida multiplicación de las levaduras alcanzando una gran biomasa. Esta etapa se mantiene hasta agotar el oxígeno disuelto en el mosto. Una vez agotado el oxígeno, las levaduras comienzan a seguir la vía fermentativa⁴⁻⁶.

En la segunda etapa, la vía fermentativa, el ácido pirúvico formado en la glicólisis o glucólisis se descarboxila a acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa, y éste a su vez, se reduce a etanol, donde la NADH (nicotinamida adenín dinucleótido) se reoxida a NAD⁺, y es catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa, como se muestra en la siguiente reacción:



Pero no todas las moléculas de azúcares del mosto van a seguir esta ruta hasta la obtención de etanol y anhídrido carbónico, sino que dependiendo del propio metabolismo de las levaduras, una parte de los azúcares son degradados mediante la fermentación gliceropirúvica, en la que además del glicerol (segundo componente cuantitativamente más importante después del etanol en el vino) se forma ácido pirúvico, este compuesto dará origen a los diferentes productos secundarios de la fermentación alcohólica: Ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, entre otros metabolitos que surgen simultáneamente de otras vías (ver *Figuras 2 y 3*), como materia nitrogenada y compuestos azufrados, necesarios para el mantenimiento de las estructuras celulares y la multiplicación de las levaduras⁷.

El metabolismo anaeróbico de la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* durante su crecimiento tiene 37 vías de reacción (rutas metabólicas)⁸, entre ellas están: La glicólisis, ciclo de Krebs (en donde se producen los ácidos orgánicos), ruta del ácido shikímico (precursor de diversos intermediarios metabólicos aromáticos, tales como los taninos, aminas biógenas aromáticas, aminoácidos aromáticos), ruta del mevalonato (en donde se producen terpenos), como se observa en la *Figura 2*.

Todos estos procesos bioquímicos quedarían englobados en lo que denominamos fermentación alcohólica como se muestra en la *Figura 3*, en donde se observa la formación de compuestos anteriormente mencionados como α -aminoácidos, ésteres, ácidos grasos, acetaldehído, etanol, alcoholes superiores entre otros.

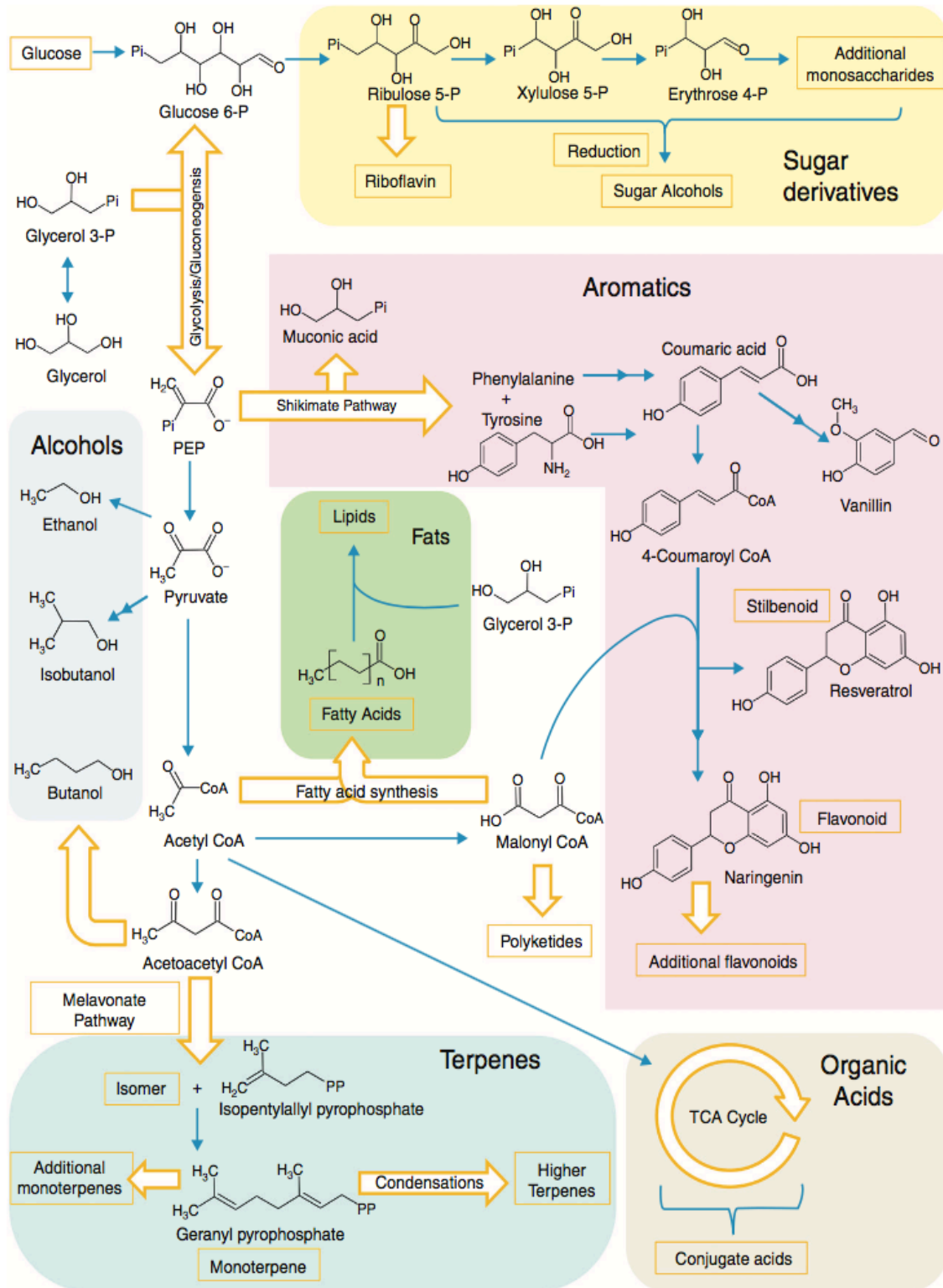


Figura 2: Vías metabólicas de levadura *Saccharomyces Cerevisiae* y sustancias generadas⁹, (Imagen tomada de: Liu, L.; Redden, H.; Alper, H. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013).

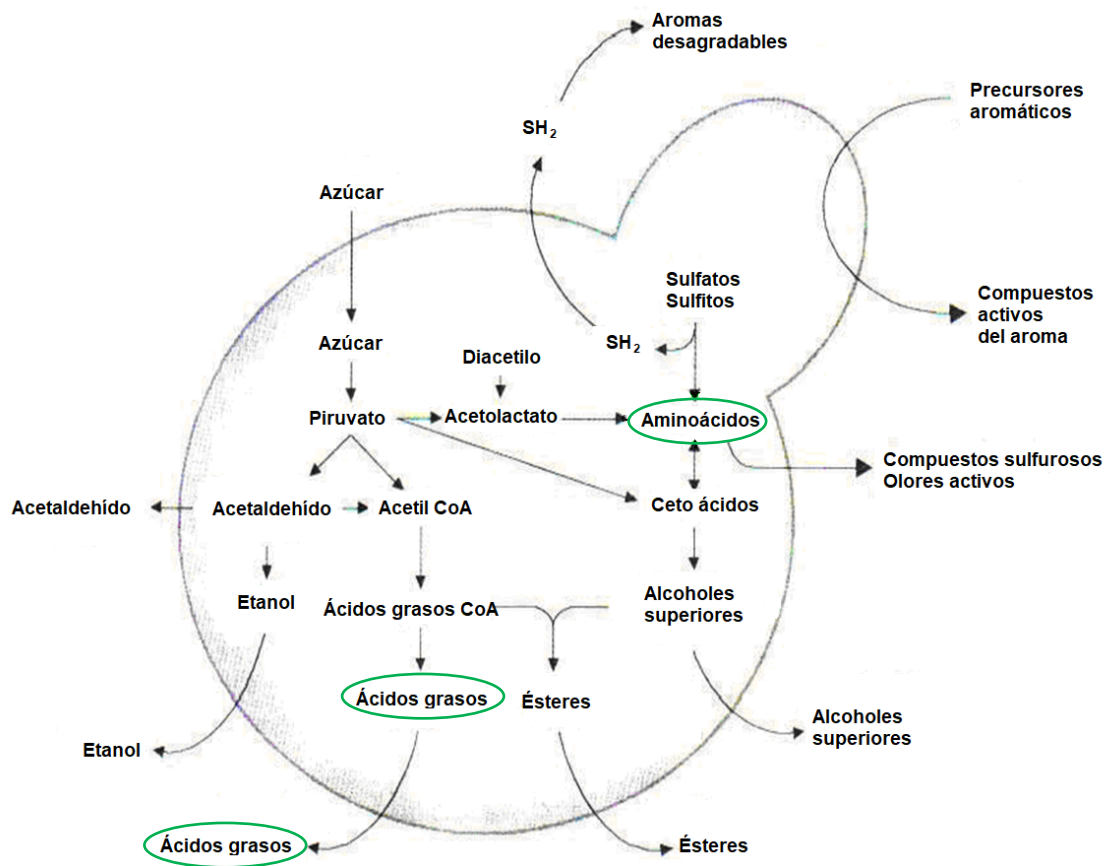


Figura 3: Formación de compuestos en la levadura⁹.

1.3 Factores importantes que influyen en la fermentación alcohólica

El desarrollo de la fermentación alcohólica, y en consecuencia la calidad del vino resultante está condicionada por factores físicos, nutrición de la levadura (metabolismo) y sustancias inhibitorias.

1.3.1 Factores Físicos

1.3.1.1 Temperatura

Es uno de los factores operacionales más influyentes en la fermentación. El control de la temperatura se realiza casi exclusivamente para evitar sobrepasar un umbral determinado, ya sea en vinos blancos (inferior a 20 °C) o vinos tintos (28 a 32 °C), los cuales pueden afectar características organolépticas y generar defectos en el proceso^{10,11}.

La velocidad de crecimiento de las células de levadura está fuertemente influenciada por la temperatura en la fermentación alcohólica, particularmente durante la fase de crecimiento exponencial (ver *Figura 1*). Temperaturas extremas durante la fermentación puede afectar severamente el metabolismo y crecimiento de las levaduras. A altas temperaturas, la fluidez de la membrana de la célula se incrementa y el etanol puede entrar más fácilmente en la célula, afectando negativamente el metabolismo y viabilidad de la misma¹².

Por encima de los 30 °C, la fermentación se acelera y corre el riesgo de una detención prematura, particularmente si tiene un contenido alto de azúcares mayor de 230 g/L.

Acorde con Santamaría *et al.*¹³ y Rozes *et al.*¹⁴, la temperatura influye sobre la evolución de los ácidos grasos de cadena media ($C_{6:0}$ a $C_{12:0}$) que son tóxicos para la levadura e inhibidores de la fermentación alcohólica, cuya síntesis se inicia rápidamente desde el inicio, alcanzando sus concentraciones más elevadas a temperaturas bajas (13-14 °C), es decir, la temperatura tiene una relación inversa con la síntesis de ácidos grasos de cadena media.

Los MCFA son intermediarios en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga durante la fermentación alcohólica del mosto por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*^{12,15}.

También se ha estudiado el efecto de la temperatura a 13 y 25 °C, en un proceso de fermentación alcohólica del vino con diferentes especies de levadura *Saccharomyces* como la *cerevisiae* y *bayanus*.

En este estudio se demostró que para la levadura *S. cerevisiae* tuvo un incremento en las concentraciones de MCFA al disminuir la temperatura, mientras que las concentraciones de LCUFA disminuyeron significativamente al incrementarse la temperatura.

Para el caso de la levadura *S. bayanus* las concentraciones de MCFA fueron más altas que en *S. cerevisiae* al disminuirse la temperatura y no hubo cambios en las concentraciones de los LCUFA al variarla.

Algunos de los resultados de este estudio se pueden observar en la *Tabla 1*.

Tabla 1: Porcentaje de ácidos grasos en tres especies de levadura, a dos diferentes temperaturas de fermentación¹⁴.

	<i>S. cerevisiae</i> A		<i>S. cerevisiae</i> B		<i>S. bayanus</i> C	
	25 °C	13 °C	25 °C	13 °C	25 °C	13 °C
Ácido Octanoico (C _{8:0})	0,94 ± 0,18	1,18 ± 0,35	1,51 ± 0,35	2,12 ± 0,40	1,36 ± 0,33	3,12 ± 0,45
Ácido Decanoico (C _{10:0})	9,54 ± 2,47	8,64 ± 1,81	13,59 ± 0,80	14,67 ± 1,16	9,70 ± 0,92	19,21 ± 1,37
Ácido Dodecanoico (C _{12:0})	5,14 ± 2,05	2,15 ± 0,56	8,08 ± 0,42	5,20 ± 0,58	11,08 ± 1,32	13,76 ± 0,70
ΣMCFA	15,61±4,70	11,97±2,69	23,18±1,14	21,99±1,32	22,13±2,56	36,09±2,21
Ácido Mirístico (C _{14:0})	0,32 ± 0,18	0,39 ± 0,02	0,67 ± 0,15	0,28 ± 0,13	1,94 ± 0,19	2,16 ± 0,44
Ácido Palmítico (C _{16:0})	35,31 ± 2,51	29,73 ± 2,60	43,61 ± 3,55	39,80 ± 3,31	43,13 ± 1,16	33,82 ± 2,61
Ácido Estearico (C _{18:0})	20,29 ± 1,71	11,55 ± 0,29	17,46 ± 0,99	10,17 ± 1,15	14,72 ± 1,54	8,37 ± 0,89
ΣSFA	55,93±1,22	41,67±2,34	61,73±2,48	50,25±2,41	59,78±0,59	44,34±1,81
Ácido Miristoleico (C _{14:1})	0,00	0,29 ± 0,07	0,00	0,18 ± 0,04	0,00	0,46 ± 0,02
Ácido Palmitoleico (C _{16:1})	16,64 ± 2,60	26,10 ± 1,09	7,25 ± 0,57	18,28 ± 1,80	9,54 ± 0,55	12,22 ± 0,52
Ácido Oleico (C _{18:1})	11,82 ± 2,03	19,98 ± 3,91	7,83 ± 1,33	9,30 ± 1,46	8,47 ± 1,56	6,88 ± 0,95
ΣUFA	28,46±4,22	46,37±4,93	15,09±1,64	27,76±2,01	18,09±2,04	19,57±1,14

Los valores son expresados como porcentajes de ácidos grasos totales.

Ellos son la medida ± desviación estándar de tres fermentaciones independientes.

MCFA: Ácidos grasos de cadena media

SFA: Ácidos grasos saturados

UFA: Ácidos grasos insaturados

La adaptabilidad de diferentes especies de levaduras del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*) a diferentes temperaturas (12 y 28 °C) en un proceso de fermentación del vino demostró una mejor adaptación a baja temperatura para levadura *S. kudriavzevii* que la *S. cerevisiae*¹⁶.

La temperatura también juega un papel importante en la asimilación de α-aminoácidos por las levaduras durante el desarrollo de la fermentación alcohólica, la asimilación disminuye cuando las temperaturas son bajas (14 °C) y la fermentación alcohólica se hace más lenta¹⁷.

El efecto de la temperatura a 32 °C no se había estudiado con anterioridad a esta investigación, por lo tanto, se consideró debido a que son posibles de alcanzar durante el proceso de fermentación y pueden generar fermentaciones con problemas.

1.3.1.2 pH

La levadura *Saccharomyces* es tolerante a pH bajos en un rango de 3,0 a 4,2¹. Una fermentación se desarrolla óptimamente con un pH de 3,5. Según Jackson³, a un bajo pH, se favorece la absorción de algunos α -aminoácidos por suministro de protones utilizados en el transporte a través de la activación de membrana de la célula. También, a pH bajos dificulta el desarrollo de microorganismos (bacterias) potencialmente competitivos en el mosto. El efecto más conocido del pH es concerniente con la hidrólisis de etil y acetatos de ésteres, en el que la ruptura de enlaces ocurre más rápido a valores de pH bajos³. Ribereau-Gayon¹⁸, señala que el pH disminuye, particularmente por el incremento en la concentración de ácido acético durante la fermentación de mostos ricos en azúcares.

1.3.2 Nutrición de la levadura

1.3.2.1 Compuestos nitrogenados

Como la inmensa mayoría de los organismos vivos, las levaduras necesitan cierta cantidad de materia nitrogenada para formar sus estructuras celulares y reproducirse. En el mosto hay distintas fuentes de materia nitrogenada, pero las levaduras no tienen la misma afinidad por ésta.

En el estudio realizado por Jones y Pierce¹⁹, se determinó la velocidad de absorción o asimilación de aminoácidos en el mosto con diferentes cepas de levaduras, éstas siguieron una secuencia que era independiente de las condiciones empleadas. Los resultados de este estudio pueden observarse en la *Tabla 2*:

Tabla 2: Asimilación de compuestos nitrogenados por *S. cerevisiae*^{19,20}.

Grupo	Características	Compuestos
A	Rápidamente absorbidos	Arginina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, lisina, serina y treonina, ácido glutámico.
B	Lentamente absorbidos	Histidina, metionina, valina, leucina, isoleucina.
C	Absorbidos después de agotar los grupos A y B.	Glicina, triptófano, tirosina, alanina, fenilalanina, ión amonio.
D	Absorción parcial o nula	Prolina

A la suma del ion amonio y los α -aminoácidos, a excepción de la prolina, se le denomina Nitrógeno Fácilmente Asimilable o más conocido por sus siglas en inglés FAN (Free Assimilable Nitrogen), y constituye la principal fuente de materia nitrogenada utilizada por las levaduras. La desaparición del ion amonio y la mayor parte del FAN se produce rápidamente durante los primeros días de la fermentación. Este rápido agotamiento no se debe solo a la metabolización por parte de las levaduras, sino a que además las levaduras almacenan el FAN en las vacuolas para una utilización posterior, cuando las alteraciones en la membrana plasmática debidas al incremento de la concentración de etanol impidan su captación²¹.

Las necesidades de FAN se incrementan con el aumento de la concentración de azúcares en el mosto y puede variar significativamente en función de la cepa de levadura. Pszczółkowski¹¹ señala que en Chile durante las últimas temporadas, se nota una tendencia en la industria vitivinícola a cosechar las uvas con estados de madurez muy avanzados, es decir, con concentraciones de azúcares mayores de 230 g/L, cuando idealmente las uvas deben ser cosechadas con contenidos de azúcares entre 190-210 g/L (tolerancia de la *Saccharomyces cerevisiae*).

Niveles óptimos de FAN están entre 250-300 mg/L. La deficiencia de FAN (150-200 mg/L) puede conducir una disminución en la velocidad de la fermentación y paradas prematuras de la misma, ya que el nitrógeno se utiliza en la biosíntesis de las proteínas que participan en el sistema de transporte de los azúcares³. La falta de FAN también se relaciona con la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S), cantidades significativas de H₂S restringe la síntesis de α -aminoácidos, incidiendo negativamente en la composición aromática del producto final. Un exceso de compuestos nitrogenados en el mosto, y posteriormente en el vino obtenido, puede tener un impacto negativo en la calidad aromática y la estabilidad microbiológica¹⁵.

1.3.2.2 Oxígeno

A pesar de que la fermentación alcohólica se desarrolla en condiciones anaerobias, es necesario aplicar pequeñas cantidades de oxígeno para la viabilidad celular, es decir, el

oxígeno cumple también un papel importante en el desarrollo de la fermentación alcohólica, aumentando la población máxima de levaduras y prolongando su capacidad fermentativa. Sin embargo, su aporte se hace de manera muy empírica, lo que conlleva a no tener establecida la cantidad y tiempo de aplicación durante la fermentación. En Chile, ha existido una tendencia a evitar al máximo su aplicación (con el fin de aminorar sus efectos oxidativos sobre el color), lo cual ha contribuido a las paralizaciones en la fermentación¹¹.

La influencia del oxígeno en la fermentación alcohólica conducida por levaduras aerobias facultativas puede ser inhibitoria o estimulante, según la dosis. Acorde a Pszczółkowski¹¹, se conocen varios factores como el oxígeno que afectan la producción de ácidos grasos y los α -aminoácidos.

El oxígeno disuelto permite que las levaduras sintetizen esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga (C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}) constituyentes esenciales de su membrana celular y “factores de supervivencia” para las últimas etapas de la fermentación. Estos compuestos se encuentran en la membrana mitocondrial y citoplasmática. La fluidez de dichas membranas dependerá de la composición en LCUFA y esteroides presentes. La participación en la fluidez de la membrana relaciona directamente a estos compuestos con el transporte de nutrientes (α -aminoácidos y azúcares) a través de esta y con la resistencia a las sustancias tóxicas producidas por las levaduras durante la fermentación, principalmente etanol y MCFA. Una buena oxigenación inicial permite la presencia de LCUFA en las células de levadura aumentando su viabilidad y permitiendo una buena finalización de la fermentación³.

La biosíntesis celular de ácidos grasos, esteroides y fosfolípidos durante la fermentación alcohólica por las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* con diferentes disponibilidades de oxígeno (estrictamente anaeróbica, semi-aeróbica y anaeróbica con corta aireación) demostró que las condiciones de fermentación afectan las proporciones de ácidos grasos en la membrana celular, esto inhibe la biosíntesis de los LCUFA, ácidos oleico y palmitoleico en condiciones anaeróbicas en ambas levaduras.

Este estudio fue llevado a cabo en la variedad *Pedro Ximénez* pero aún no se ha realizado con diferentes disponibilidades de oxígeno en la fermentación del mosto *Carménère*²².

La privación de oxígeno durante la fermentación alcohólica del mosto de uva induce cambios cualitativos y cuantitativos en la composición lipídica de la célula¹². Durante la fermentación se observó en los LCUFA un decrecimiento rápido en sus niveles por la deficiencia de oxígeno y como resultado, se obtuvieron fermentaciones lentas²³. La privación de oxígeno favorece la producción de MCFA, especialmente el ácido octanoico y decanoico los cuales demostraron ser tóxicos para la levadura²⁴.

Adicionalmente, se evaluó en el mosto *Sauvignon blanc*, las adiciones de oxígeno y dióxido de azufre, demostrando que esto afecta los niveles de compuestos volátiles y no volátiles, incluyendo los metoxipirazinas, tioles volátiles, ésteres, alcoholes, ácidos grasos, monoterpenos, glutatión y compuestos fenólicos²⁵.

1.3.3 Sustancias Inhibitorias

1.3.3.1 Etanol

La acumulación de etanol durante la fermentación de azúcares por la levadura puede conllevar a la inhibición de su mismo proceso de fermentación y causar desfavorables efectos en la célula, es decir, inhibe el crecimiento y viabilidad de las levaduras.

El etanol actúa sobre la membrana sustituyendo las moléculas de agua de su interior por moléculas de alcohol, alterando el transporte de α -aminoácidos y azúcares, al aumentar la rigidez de la membrana y modificar la permeabilidad de ésta. El etanol interactúa con la membrana posiblemente introduciéndose en el interior hidrofóbico y aumentando la polaridad de esta región, permitiendo de este modo el libre intercambio de moléculas polares y el debilitamiento de la interacción hidrofóbica. También se conoce que el etanol produce cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática de la célula, provocando una modificación en la fluidez de la membrana¹².

1.3.3.2 Ácidos grasos de cadena media (MCFA)

Aparte del etanol, los MCFA constituyen otro tipo de inhibidor durante la fermentación alcohólica, la cantidad de dichos ácidos en el medio depende de la cepa de levadura, composición del medio y condiciones de la fermentación (temperatura, oxigenación, pH, agitación).

Los MCFA son altamente dependientes del pH del medio, por ejemplo, incrementan su toxicidad cuando el pH decrece, indicando que las moléculas no disociadas son más tóxicas. Los ácidos grasos de cadena media ($C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico) actúan sinérgicamente con el etanol, uniéndose a la membrana y ocupando sitios activos para el transporte¹².

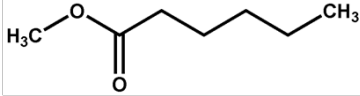
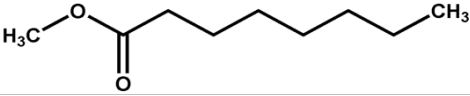
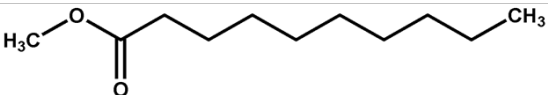
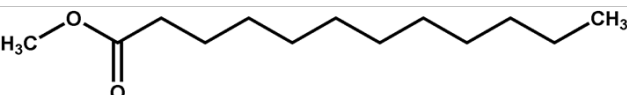
A continuación, los antecedentes se centran en los compuestos que se estudiaron en esta tesis (MCFA, LCUFA y α -aminoácidos) y los estudios referentes a ellos hasta la fecha.

1.4 Ácidos Grasos

Un ácido graso es una biomolécula de naturaleza lipídica formada por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Los ácidos grasos se clasifican en ácidos saturados o insaturados (con uno o varios dobles enlaces). La mayoría de ácidos grasos de configuración *cis* se encuentra en los seres vivos⁶ y suelen ser líquidos a temperatura ambiente.

Los ácidos grasos en el vino provienen de la piel o cáscara de la uva. Sin embargo, la mayor cantidad de estos se forman durante la fermentación alcohólica liberados por la levadura (son biosintetizados a partir de la acetil-CoA). Los ácidos grasos en el vino se encuentran de dos formas: Libres (C_n : Ácido grasos con n número de carbonos) o enlazados, principalmente como etil ésteres (C_nE : Etil ester del ácido graso C_n) y/o metil ésteres (C_nM : Metil éster del ácido graso C_n)²⁶ como se observan en las *Tablas 3, 4 y 5*.

Tabla 3: Estructuras químicas de ácidos grasos metilados saturados²⁷.

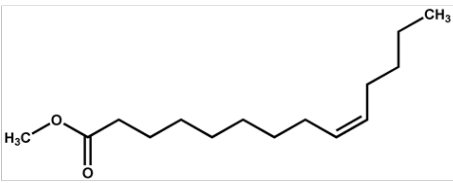
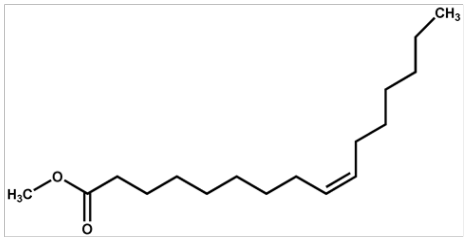
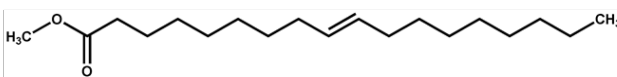
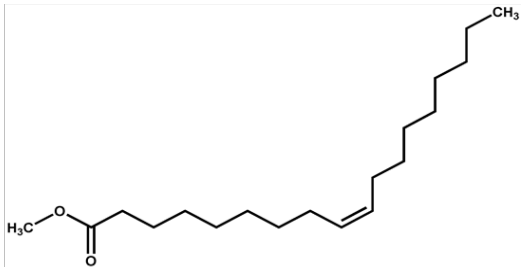
Ácidos grasos	Carbonos	Estructuras
Saturados		
Metil Hexanoato	C _{6:0}	
Metil Octanoato	C _{8:0}	
Metil Decanoato	C _{10:0}	
Metil Laurato	C _{12:0}	

La biosíntesis de los ácidos grasos por las levaduras empieza con la formación del acetyl coenzima A (acetyl-CoA), ésta es formada por la descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico. Una vez que se ha formado la acetyl-CoA en el citoplasma puede dar inicio la síntesis de ácidos grasos, ver *Figura 4*.

De manera general, la enzima Acetyl-CoA carboxilasa convierte primero la acetyl-CoA en malonil-CoA, que es utilizado por el ácido graso sintetasa (enzima compleja) que se lleva a cabo por condensaciones repetitivas entre la enzima enlazada a acetyl-CoA y malonil-CoA, las cuales formarán el ácido palmítico (un ácido graso saturado de 16 átomos de carbono).

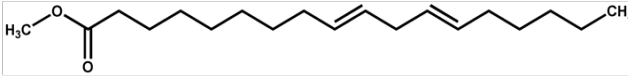
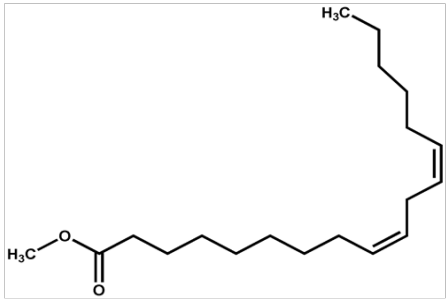
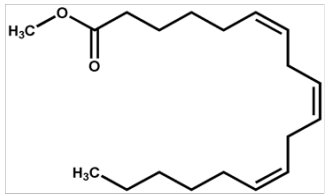
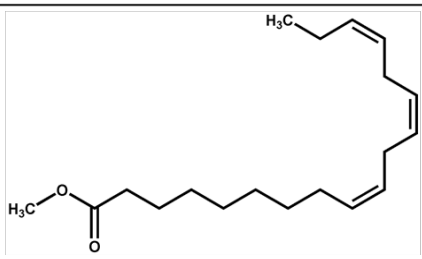
A partir del ácido palmítico (palmitato en su forma ionizada) se podrán sintetizar otros ácidos grasos de cadenas más largas o más cortas, también se podrá llevar a cabo la formación de dobles enlaces⁷.

Tabla 4: Estructuras químicas de ácidos grasos metilados insaturados²⁷.

Ácidos grasos	Carbonos	Estructuras
Insaturados		
Metil Miristoleato	$C_{14:1}$	
Metil Palmitoato	$C_{16:1}$	
Metil Octadecanoato	$C_{18:1n9t}$	
Metil Oleato	$C_{18:1n9c}$	

Cabe mencionar, que la mayoría de los ácidos grasos contienen número par de átomos de carbono porque estos se biosintetizan a partir de subunidades de acetilo (Acetil-CoA) que contiene dos átomos de carbono⁶.

Tabla 5: Continuación estructuras químicas de ácidos grasos metilados insaturados²⁷.

Ácidos grasos	Carbonos	Estructuras
Insaturados		
Metil Linoleidato	$C_{18:2n6t}$	
Metil Linoleato	$C_{18:2n6c}$	
Metil γ -Linolenato	$C_{18:3n6}$	
Metil Linolenato	$C_{18:3n3}$	

El contenido de ácidos grasos saturados e insaturados se identificaron y cuantificaron en estudios previos^{26,28,29}, ver *Tablas 6 y 7*.

Este contenido se determinó en mostos de diferentes variedades como *Viura, Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Pinot noir, Syrah Merlot, Cabernet Sauvignon, Kiyomi, Zweigeltrebe, Muscat Bailey*, al inicio, medio y final de una fermentación, y en vinos terminados por cromatografía gaseosa con detector de llama (GC-FID).

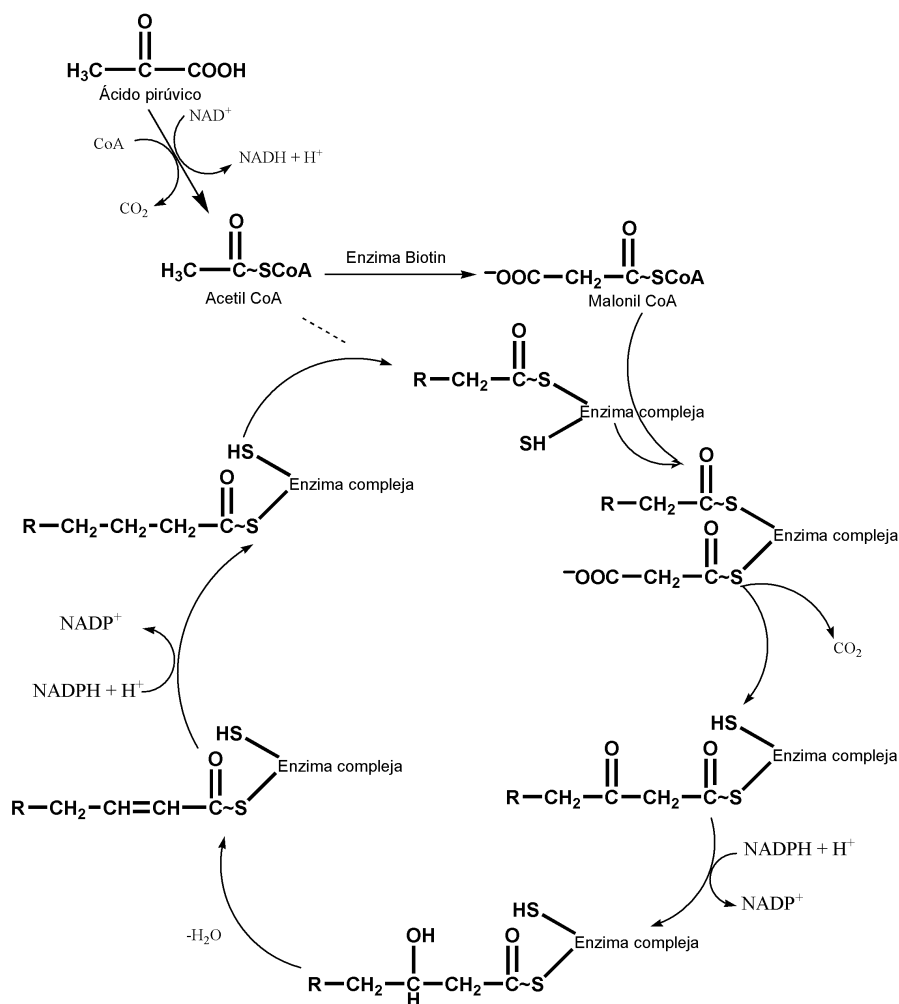


Figura 4: Biosíntesis de los ácidos grasos por la levadura *S. cerevisiae*⁷.

No se había reportado el contenido de ácidos grasos en la cepa *Carménère* hasta esta investigación y en diferentes puntos (t=0, t=24, t=48, t=72, t=96 y t=120 horas) de la fermentación alcohólica.

Tabla 6: Concentración (mg/L) de ácidos grasos en mosto y vino²⁶.

Ácidos Grasos	Mosto (mg/L)	Vino (mg/L)
<i>C</i> ₆	0,063±0,007	4,434±0,231
<i>C</i> ₈	0,027±0,004	12,086±0,469
<i>C</i> ₁₀	0,013±0,001	2,967±0,149
<i>C</i> ₁₂	0,17±0,02	0,473±0,042

Medida ± SD (desviación estándar), n=9.

Tabla 7: Concentración (mol %) de ácidos grasos en vinos rojos comerciales²⁹.

Variedad	Área de cosecha	C _{12:0}	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
<i>Kiyomi</i>	Japón	15,1±2,9	3,3±0,2	6,8±1,7	7,7±1,3	1,3±0,6
<i>Kiyomai</i>	Japón	14,4±3,1	6,3±0,8	5,9±1,5	4,3±1,7	0,9±0,3
<i>Zweigeltrebe</i>	Japón	14,3±2,4	7,7±4,5	6,5±0,9	3,6±0,8	0,8±0,5
<i>Muscat Bailey A</i>	Japón	13,2±5,8	4,1±2,3	8,0±0,9	10,5±1,1	2,4±0,4
<i>Merlot</i>	Japón	14,0±2,8	4,5±0,1	6,9±0,8	14,1±1,8	2,8±1,9
<i>Cabernet Sauvignon</i>	Japón	15,3±4,9	6,7±0,4	4,8±1,2	3,3±1,8	1,0±0,7
<i>Cabernet Sauvignon</i>	Francia	8,4±6,4	2,8±3,1	13,4±0,7	4,5±0,8	2,6±0,5
<i>Cabernet Sauvignon</i>	Chile	15,5±3,2	7,7±0,2	7,3±3,4	5,5±0,8	1,2±3,8
<i>Cabernet Sauvignon</i>	U.S.A	13,3±4,6	5,2±2,1	4,9±1,6	6,4±4,0	2,1±0,5
<i>Tempranillo</i>	España	15,3±1,6	2,7±2,6	6,1±0,7	5,1±2,5	0,9±0,7
<i>Pinot noir</i>	Francia	11,7±1,4	3,0±1,9	7,1±3,0	3,2±4,3	0,8±0,4
<i>Syrah</i>	Australia	14,7±2,7	2,1±0,5	4,2±5,3	7,3±1,3	2,1±0,7

Medida ± S.D. en análisis por triplicado.

(mol %)=(n_i/n_t) *100%, donde n_i son las moles de cada ácido graso y n_t son las moles totales de ácidos grasos.

En la cuantificación de ácidos grasos en mosto y vino blanco por Cromatografía Gaseosa se compararon dos métodos de derivatización para la formación de ésteres: Con una base y con un ácido. Solo en la condición ácida se encontró que hubo recuperaciones entre 106-335% de los metil ésteres, pero no hubo recuperaciones de los etil ésteres cuando se utilizó metóxido de sodio; mientras que se tuvo recuperaciones entre 95-181% de los metil ésteres y entre 65-79% de los etil ésteres cuando se usó ácido sulfúrico al 3% en metanol. Adicionalmente para ambas derivatizaciones, se estudió la influencia de la temperatura (ambiente y 100 °C) y se probó que hubo una mejor conversión a los metil ésteres a temperatura ambiente que a 100 °C²⁶.

Debido a la gran variabilidad en las concentraciones de MCFA (tóxicos e inhibidores) y de LCUFA (factores de supervivencia) por múltiples factores como la temperatura y el oxígeno que influyen en el transcurso de la fermentación alcohólica, fue de gran interés conocer las concentraciones de estas sustancias en la cepa *Carmènère* por el rol importante que juegan durante el proceso.

1.5 Aminoácidos

La estructura general de un α -aminoácido estará determinada por la presencia de un carbono central α , unido a su vez a un grupo carboxilo, un grupo amino, un hidrógeno y una cadena lateral como se observa en la *Tabla 8*.

Tabla 8: Estructuras α -aminoácidos²⁷.

Nombre	Abreviatura	Estructura
Ácido glutámico	Glu	
Arginina	Arg	
Alanina	Ala	
Glutamina	Gln	
Prolina	Pro	

Los α -aminoácidos son precursores de las proteínas, que son importantes en el metabolismo de las levaduras ya que participan en el sistema de transporte de los azúcares. También los α -aminoácidos del medio se encuentran entre los más importantes factores que influyen en la formación de alcoholes superiores, los cuales juegan un rol importante en el carácter sensorial y calidad del vino^{1,7}.

Los α -aminoácidos que están presentes en el mosto de uva son la principal fuente de alcoholes superiores, pero estos no solo se biotransforman en alcoholes superiores sino también en aldehídos, ésteres y cetoácidos. Ellos también tienen una influencia sobre la

composición aromática del vino. Proviene de diversos orígenes, algunos son propios de la uva y pueden estar parcial o totalmente metabolizados por levaduras vivas al final de la fermentación o liberados de levaduras muertas; otros son producidos por degradación enzimática de proteínas de la uva^{30,31}. Son de gran importancia en la producción del vino porque actúan como fuente de nitrógeno para las levaduras durante la fermentación, estos representan el 30-40% del nitrógeno total en el vino.

En estudios previos^{28,32}, identificaron y cuantificaron el contenido de dieciséis α -aminoácidos en un rango de concentración entre 2,0-790 mg/L por HPLC con detector ultravioleta (UV), en siete vinos rojos franceses, los aminoácidos más abundantes fueron arginina, ácido glutámico, alanina y prolina, los resultados se pueden ver en la *Tabla 9*.

Tabla 9: Rangos de concentración (mg/L) de α -aminoácidos en vinos rojos³².

Aminoácido	Abreviatura	Concentración (mg/L)
Arginina	Arg	23-64
Ácido aspártico	Asp	8,6-19
Serina	Ser	7,1-14
Ácido glutámico	Glu	26-54
Treonina	Thr	5,4-10
Glicina	Gly	11-20
Alanina	Ala	26-64
Prolina	Pro	380-790
Metionina	Met	0
Valina	Val	3,6-9,1
Fenilalanina	Phe	7,3-22
Isoleucina	Ile	2,4-5,9
Leucina	Leu	6,0-13
Histidina	His	3,5-11
Lisina	Lys	7,5-17
Tirosina	Tyr	2,0-7,5
Total		393-1050

Como se mencionó anteriormente, a la suma del ion amonio y los α -aminoácidos (fuentes de nitrógeno para la levadura), a excepción de la prolina, se le denomina Nitrógeno Fácilmente Asimilable (FAN). Muchas de las investigaciones solo se han centrado en

estudiar la influencia del NH_4^+ o como compuestos nitrogenados la suma de todos los aminoácidos y no de una forma individual.

Cabe resaltar que hay una gran cantidad de factores que pueden afectar la presencia o contenido de α -aminoácidos en el vino como: El origen geográfico, condiciones climáticas, la fertilización, la duración de la cáscara en el mosto, la variedad de la uva, prácticas enológicas, el metabolismo de las levaduras, condiciones de la fermentación como la temperatura y el pH^{30,31,33}.

En la *Tabla 10*, identificaron y cuantificaron el contenido de aminoácidos al inicio de una fermentación, en el medio y al final de esta, en un mosto *Viura* por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC). El objetivo de este estudio fue observar la influencia del contenido de ácidos grasos y su evolución durante la fermentación sobre la utilización de aminoácidos libres en mosto clarificado por filtración al vacío. Los resultados demuestran que la filtración del mosto no redujo la concentración de aminoácidos libres, pero sí redujo los ácidos grasos, especialmente los insaturados. En la primera mitad de la fermentación, la utilización de ácidos grasos fue diferente en cada muestra sin implicar una alteración en la absorción de aminoácidos. En la segunda mitad de la fermentación, la muestra clarificada tuvo un mayor consumo de ácidos grasos saturados que insaturados, esto, junto con otros factores, produjo una mayor liberación de aminoácidos libres en la muestra filtrada.

Tabla 10: Concentraciones (mg/L) de α -aminoácidos en mosto *Viura*²⁸.

Aminoácidos	Inicio de la Fermentación (mg/L)	Mitad de la Fermentación (mg/L)	Final de la Fermentación (mg/L)
Arginina	148±11	0,71±0,04	2,7±0,9
Prolina	117±10	18±5	282±22

Medida \pm SD (desviación estándar), n=4.

Soufleros *et al.*³¹ encontraron que para las variedades de *Chardonnay*, *Muscat White* y *Muscat d'Alexandrie* tienen un contenido alto de aminoácidos (L-arginina, ácido gamma aminobutírico) con concentraciones entre 125-199 mg/L, mientras que las variedades *Roditis*, *Debina*, *Mocschofilero*, *Asyrtiko* fueron caracterizados con cantidades más bajas

de aminoácidos libres (L-arginina, ácido gamma aminobutírico, lisina, alanina, glicina, ácido aspártico y leucina) con concentraciones entre 16,3-75,1 mg/L.

Debido a la gran variabilidad en las concentraciones de α -aminoácidos por múltiples factores como la temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno³⁴ que influyen en el transcurso de la fermentación alcohólica, fue necesario conocer las concentraciones de estas sustancias en la cepa *Carmènère*.

A continuación, se presentan metodologías analíticas basadas en técnicas espectroscópicas en combinación con métodos quimiométricos para la cuantificación de ácidos grasos y aminoácidos.

1.6 Metodologías analíticas utilizadas en la fermentación alcohólica

1.6.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (IR-TF)

Los procedimientos convencionalmente usados para determinar ácidos grasos involucran la extracción de éstos, seguido de la conversión de los ácidos grasos a sus metil ésteres y posterior análisis por Cromatografía Gaseosa (GC). Estos análisis son laboriosos, costosos y generan muchos residuos tóxicos^{10,26}.

Desarrollar un método analítico novedoso, rápido, económico, y amigable con el ambiente en una matriz compleja ayudará a determinar cuáles y que cantidad de ácidos grasos afectan la fermentación alcohólica del vino y así poder actuar rápidamente corrigiendo y/o evitando en algunos casos fermentaciones con problemas. Esas características las ofrece la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF).

Las aplicaciones de la técnica espectroscópica en el infrarrojo medio IR-TF(MIR) 400-4000 cm^{-1} para el análisis en alimentos, se ha incrementado durante la última década³⁵⁻⁴¹ debido al rápido desarrollo comercial y extensa investigación. La espectroscopía infrarroja es considerada una de las más poderosas técnicas para el análisis químico^{42,43}. También

porque el uso de ésta en combinación con herramientas quimiométricas ha permitido identificar y cuantificar no solo una sustancia si no varias al mismo tiempo, además, esta técnica ha dado excelentes resultados para caracterización y clasificación de vinos, brandis y bebidas destiladas⁴⁴, clasificación de vinos rojos por su origen geográfico⁴⁵, clasificación y cuantificación de taninos en vinos rojos⁴⁶.

Inicialmente, para el monitoreo de fermentaciones^{47,48}, se usaron la espectroscopía en el infrarrojo cercano IR-TF(NIR) 4000-13000 cm^{-1} para determinar glucosa, fructosa, etanol y compuestos fenólicos en combinación con herramientas quimiométricas de calibración multivariante mínimos cuadrados parciales (PLS), y adicionalmente se ha determinado MCFA en aceites⁴⁹.

Según Malherbe *et al.*¹⁵, el uso de la tecnología IR-TF(MIR) para análisis de vinos es debida a la necesidad de determinaciones más precisas con más constituyentes de lo que ofrece la región cercana (NIR). En la *Tabla 11*, se muestran algunas ventajas y desventajas de las técnicas IR-TF(NIR) e IR-TF(MIR).

La elección entre un IR-TF(NIR) e IR-TF(MIR) depende principalmente del tipo de muestra y análisis⁴³. Los espectrofotómetros IR-TF(MIR) son comúnmente usados para el análisis rutinario de vino y están equipados con un módulo de reflectancia total atenuada (ATR) que permite una mejor precisión y reproducibilidad de las medidas espectroscópicas y un fácil control de la temperatura^{38,39}.

En años recientes el uso espectroscopía MIR ha sido reportada para la cuantificación de varios parámetros en el vino con ayuda de herramientas quimiométricas (PLS) tales como concentración de etanol, fenoles, ácidos orgánicos como tartárico, málico y láctico, glucosa y fructosa, glicerol, compuestos volátiles en vinos de la variedad *German, Cabernet Sauvignon*^{35,38,50}.

Tabla 11: Ventajas y desventajas de las técnicas IR-TF(NIR) e IR-TF(MIR)^{43,50}.

IR-TF(NIR)		IR-TF(MIR)	
VENTAJA	DESVENTAJA	VENTAJA	DESVENTAJA
El espectro tiene una relativa absorción débil debido a los sobretonos del agua permitiendo análisis de alimentos con alta humedad.	Espectro complejo con señales débiles y superpuestas que comprende sobretonos y combinación de absorciones.	Señales claras y fuertes en el espectro. Espectro rico en información. Medidas rápidas. Equipo fácil de manejar. Bajo impacto ecológico.	Inversión relativamente costosa. El producto depende de calibración. Limitaciones con medidas de parámetros a baja concentración.
Es menos influenciado por el dióxido de carbono atmosférico.	Las bandas en NIR son menos intensas que en MIR.	Las muestras no necesitan pretratamiento.	
Bajo costo, procedimiento simple.	El producto depende de calibración.		

La espectroscopía IR-TF acoplada a herramientas quimiométricas (calibración multivariante) ha demostrado la habilidad para cuantificar los MCFA y LCUFA en diferentes matrices como filetes de pescado⁵¹, semillas de cebada⁵², aceite de oliva⁵³ y queso suizo⁴² con una mínima cantidad de muestra, menor tiempo de preparación y menos reactivos químicos.

Dado los antecedentes anteriormente expuestos y la necesidad de cuantificar los ácidos grasos que son variables críticas en el proceso de fermentación alcohólica del vino, se propone utilizar la técnica IR-TF en el rango medio en combinación con herramientas quimiométricas (PLS) para cuantificar los ácidos grasos de interés.

Se resalta que hasta el momento no se había estudiado la evolución de MCFA y LCUFA en más de tres puntos (inicio, medio y final) en el proceso de la fermentación alcohólica y mucho menos en la cepa *Carménère*, lo cual se realizó en esta investigación. Tampoco se habían estudiado estos compuestos bajo diferentes condiciones de temperatura y oxigenaciones en la misma cepa como se mencionó anteriormente.

1.6.2 Espectroscopía Resonancia Magnética Nuclear

Por otro lado, la técnica analítica más comúnmente usada para determinar α -aminoácidos es la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), ésta conlleva una preparación de

muestra (separación, derivatización, preconcentración) más tediosa e invasiva que demanda mayor tiempo antes de la determinación. La preparación de muestra para las medidas por espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es simple y consume menos tiempo en comparación de otras técnicas como HPLC³⁰. Otra ventaja de la RMN es que permite la detección y análisis directo de la muestra con un gran número de compuestos en un simple experimento^{54,55}.

La espectroscopia RMN es una excelente herramienta para proporcionar características químicas de huella digital de gran interés para generar perfiles composicionales del vino⁵⁶. Teniendo en cuenta que el uso principal de esta técnica es para la elucidación estructural, el desarrollo de métodos por RMN se ha centrado principalmente en la mejora de la información cualitativa, aunque actualmente los aspectos cuantitativos se han abordado desde la última década⁵⁷.

El vino consta de varios cientos de componentes presentes en diferentes concentraciones: Agua, etanol, glicerol como los de mayor concentración; azúcares, ácidos orgánicos, polifenoles, α -aminoácidos entre otros los de menor concentración⁵⁸. Estos componentes han sido estudiados por RMN en muestras de vino, pero hay insuficientes estudios para el caso de los α -aminoácidos en mostos en fermentación, de ahí la importancia de esta investigación y de desarrollar nuevas metodologías para poder cuantificarlos durante la fermentación alcohólica del vino.

En ocasiones, las señales intensas como las del agua son minimizadas o eliminadas por técnicas de RMN con supresión de disolvente para que se puedan visualizar mejor las señales de baja intensidad. Se debe tener cuidado cuando se está tratando con mezclas complejas tales como el vino con respecto a las propiedades químicas tales como pH, ya que puede influenciar considerablemente el desplazamiento químico³⁰.

Algunos estudios a través de ¹³C RMN evidenciaron la transformación de α -aminoácidos (L-fenilalanina, L-leucina y L-isoleucina) a alcoholes superiores e histidina⁵⁹ durante la fermentación alcohólica del vino de la variedad *Garnacha*⁵⁸; en otro estudio realizaron clasificaciones basados en espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN y con ayuda de herramientas

quimiométricas como PCA (Análisis de Componentes Principales) para clasificar α -aminoácidos (arginina, ácido gamma aminobutírico, lisina, alanina, glicina, ac. aspártico y leucina) acorde a su variedad y origen geográfico en 21 vinos terminados comerciales y uvas^{33,60,61}. Así mismo, identificaron 17 α -aminoácidos en vinos terminados en *Cabernet Sauvignon*.

La espectroscopia RMN acoplada a herramientas quimiométricas de calibración multivariante ha cuantificado ácidos orgánicos y 12 aminoácidos en cerveza basados en espectros ^1H RMN con dos métodos de cuantificación: Con integración de señales del espectro junto con el uso de referencias de calibración y con PLS, en un espectrómetro de Bruker Avance 600 MHz. Estos métodos fueron satisfactorios para metabolitos con concentraciones por debajo de 10 mg/L y con una alta exactitud⁶².

Similarmente, en otro estudio compararon la cuantificación del método de integración tradicional con el modelo PLS de seis ácidos orgánicos en cervezas. Para el modelo de PLS se basaron en espectros de ^1H RMN y electroforesis capilar (datos de referencia), los espectros fueron tomados en un espectrómetro de Bruker Avance 500 MHz⁵⁵. De los dos estudios anteriores, se puede concluir que la cuantificación realizada por PLS tuvo concentraciones más cercanas a los valores de referencia, obteniendo así resultados más exactos que por integración de señales, por lo que se propuso para esta tesis la cuantificación con PLS para los α -aminoácidos.

Adicionalmente, se identificó etanol, ácido acético, málico, láctico, succínico y α -aminoácidos (prolina y alanina) de la variedad *Tempranillo* en un proceso de fermentación normal⁵⁷, como se puede observar en la *Figura 5*. En la misma figura, se muestran los acoplamientos de los protones encerrados en un círculo como por ejemplo, el grupo metil del etanol (triplete, $^3\text{J}=7,2$ Hz, 3H a 1,01 ppm) y señales satélites ^{13}C , para el grupo metil del ácido láctico (doblete, $^3\text{J}=6,9$ Hz, 3H a 1,40 ppm), para el grupo metil de la alanina (doblete, $^3\text{J}=7,2$ Hz, 3H a 1,46 ppm), para el grupo δ -metileno de la arginina (multiplete, 2H a 1,60-1,69 ppm), para el grupo metil del ácido acético (singlete, 3H a 2,06 ppm), para un protón del grupo β -metileno de la prolina (multiplete, 1H a 2,29-2,39 ppm), dos grupo

metilenos para el ácido succínico (singlete, 4H a 2,65 ppm), y un protón diasterotópico para el ácido málico (doble de dobletes, $^3J=8,0$ Hz, $^2J=16,4$ Hz, 1H a 2,80 ppm).

Y para su cuantificación se basaron en espectros de ^1H RMN e integración de señales junto con referencias de calibración. Cabe destacar que hasta la fecha no se ha realizado la cuantificación de aminoácidos en un proceso de fermentación con la herramienta quimiométricas PLS.

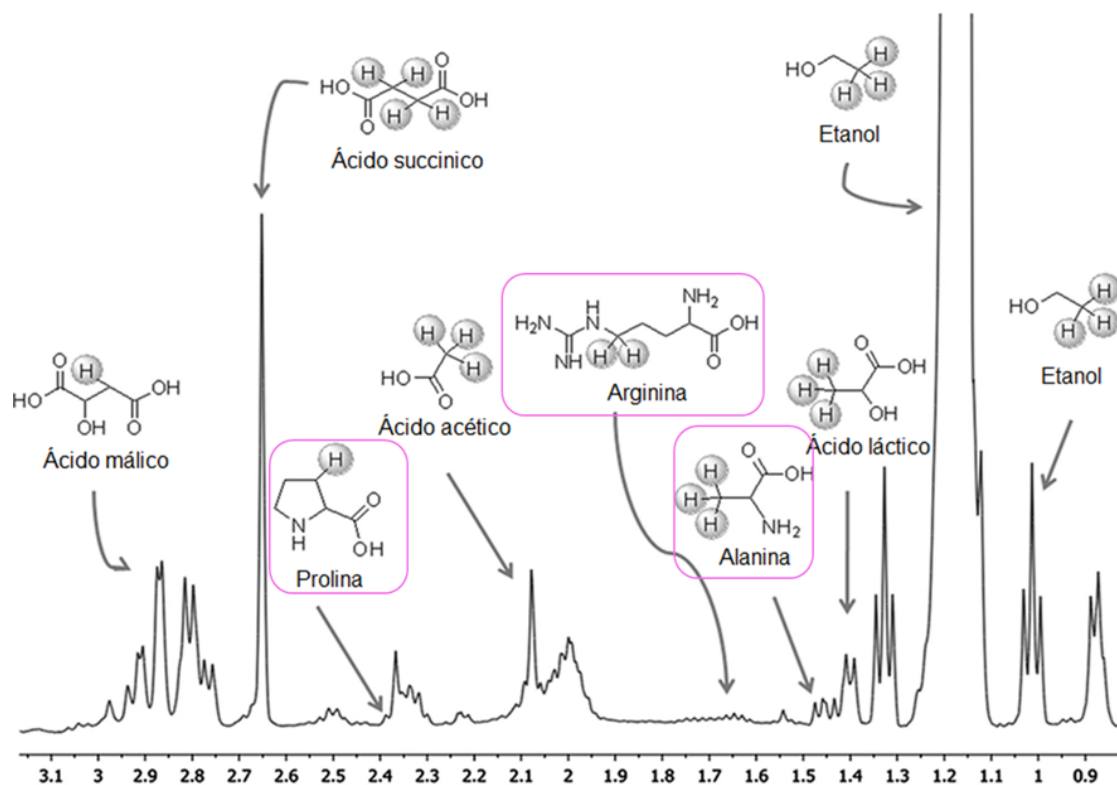


Figura 5: Espectro ^1H RMN (400 MHz) de un mosto en fermentación⁵⁷.

Du *et al.*⁶¹ determinaron el desplazamiento, multiplicidad y asignación de protones respectivamente para algunos α -aminoácidos encontrados en vinos terminados como: Prolina [2,00 δ (m, $-\text{CH}_2$), 2,07 δ (m, $-\text{CH}$), 2,35 δ (m, $-\text{CH}$), 3,33 δ (m, $-\text{CH}$), 3,43 δ (m, $-\text{CH}$), 4,13 δ (t, $-\text{CH}$)] y Alanina [1,49 δ (d, $-\text{CH}_3$, 3,83 (q, $-\text{CH}$)].

En numerosos trabajos esta técnica a nivel cuantitativo fue validada frente a otras de fiabilidad conocida como el HPLC⁶³. Pauli *et al.*⁶⁴ bautizaron a la técnica como

Resonancia Magnética Nuclear de protón cuantitativa (qHRMN) y mediante esta serie de trabajos demostraron el enorme potencial de ésta, no solo en la identificación de compuestos sino también en la cuantificación.

A continuación, se presenta el método quimiométrico PLS para desarrollar las metodologías analíticas basadas en técnicas espectroscópicas para la cuantificación de ácidos grasos y aminoácidos en mosto.

1.7 Quimiometría

La quimiometría desarrolla y usa herramientas matemáticas y estadísticas para extraer el máximo de información desde un conjunto de datos adquiridos a través de análisis químico o instrumental. La quimiometría en la química analítica tiene sus aplicaciones más importantes en metrología para la validación de métodos de análisis, en diseño de experimentos para la optimización de procedimientos, y en análisis/calibración multivariante para la clasificación de sustancias respecto a su composición química o cuantificación de especies químicas en muestras complejas minimizando etapas de análisis⁶⁵.

La quimiometría se puede clasificar en análisis cualitativos (análisis multivariante) y análisis cuantitativos (calibración multivariante):

En **análisis multivariante**, las herramientas más utilizadas son PCA (del inglés, Principal Components Analysis) para análisis exploratorios, y LDA (del inglés, Linear Discriminant Analysis) para análisis clasificatorios⁶⁶⁻⁷⁰. Usualmente se usa para la denominación de orígenes de vino.

En **calibración multivariada**, las herramientas más utilizadas son PLS (del inglés, Partial Least Squares) y PCR (del inglés, Principal Component Regression) para construir modelos de calibración y validación⁷¹. Éstas han sido ampliamente aplicadas en alimentos utilizando técnicas espectroscópicas como IR-TF y RMN⁵⁶. Un modelo de calibración multivariable relaciona las N variables experimentales, por ejemplo, un espectro MIR o

^1H RMN frente a propiedades conocidas de las muestras, por ejemplo, la concentración de un analito, siendo el objetivo la predicción de dicha propiedad en nuevas muestras.

La espectroscopía IR-TF y RMN en combinación con métodos quimiométricos proporciona información cuantitativa confiable que es importante para monitorear fermentaciones¹⁵. Los espectros del vino son extremadamente complejos, por esta razón es necesario usar herramientas avanzadas de análisis de datos para generar modelos de calibración de cada parámetro de interés.

Para la obtención de un modelo robusto se deben seguir las siguientes etapas: Selección de un conjunto de muestras, determinación de la propiedad o identidad por métodos de referencia adecuados, obtención de la señal analítica, pretratamiento de los datos, construcción del modelo, validación del modelo, predicción de nuevas muestras^{72,73}.

A continuación, se explica más detalladamente cada una de las etapas implicadas en el modelo de los datos:

1.7.1 Selección del conjunto de muestras

El primer paso es disponer de un número de muestras suficiente para la creación y validación del modelo. Las muestras utilizadas para el desarrollo de un modelo de calibración deben ser representativas de la variabilidad que pueda darse durante el proceso. Usualmente se selecciona un 75% de las muestras para la calibración (llamadas X_{cal}) y un 25% de las muestras para la validación (llamadas X_{val}), ver *Figura 6*.

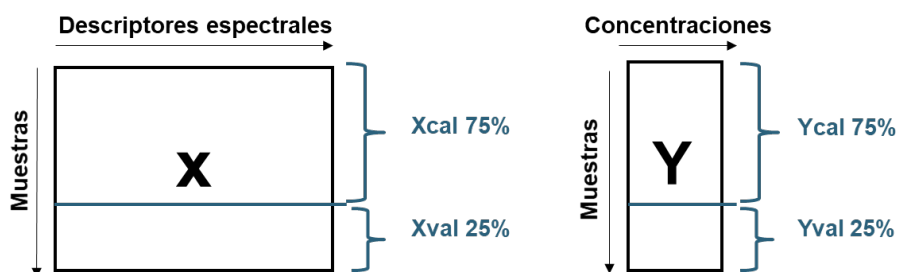


Figura 6: Construcción de matrices X y Y.

1.7.2 Método de referencia

Mediante metodologías analíticas adecuadas se determinan las concentraciones o propiedades en las muestras. Los métodos empleados deben proporcionar valores precisos y exactos, ya que de éstos dependerá la calidad y confiabilidad del modelo de calibración obtenido. Para nuestro caso, los métodos de referencia son GC-FID y HPLC-UV para ácidos grasos y α -aminoácidos respectivamente.

1.7.3 Obtención de la señal analítica

Para la obtención de la señal analítica se deben someter las muestras al procedimiento instrumental elegido. Por cada muestra se obtiene una señal espectral continua (un espectro), para nuestro caso los espectros de IR-TF(MIR) y ^1H RMN. Una vez que el sistema instrumental proporciona los datos resultantes, éstos son almacenados y quedan disponibles para su posterior tratamiento.

1.7.4 Pretratamiento de los datos

En los datos espectrales pueden aparecer contribuciones no deseadas (debido al proceso de registro, a la naturaleza de la muestra, al ruido instrumental, entre otros) que causan no linealidades u otros efectos que pueden afectar negativamente el modelo de calibración a construir. Los pretratamientos más utilizados en esta tesis fueron:

1.7.4.1 Centrado

Consiste en centrar cada una de las i variables restando la media de todos los elementos de esa variable. Los vectores centrados tienen valor medio igual a cero, sin modificar la varianza. El centrado es un pretratamiento habitual previo al desarrollo de un modelo de calibración o de un análisis en componentes principales, *ecuación (1)*.

$$\hat{x}_i = (x_i - \bar{x}) \quad (1)$$

1.7.4.2 Autoescalado

Consiste en un centrado seguido de una normalización. Para una matriz X (MxN) cada elemento de una fila se autoescala, *ecuación (2)*.

$$x'_i = \frac{x_i - \bar{x}}{s} \quad (2)$$

donde x'_i es el valor autoescalado, \bar{x} y s son la media y la desviación estándar de los elementos de esa fila. Los datos autoescalados tienen media 0 y varianza 1.

1.7.4.3 Variable Normal Estándar (SNV, Standard Normal Variate)

Con este pretratamiento se centra y autoescala cada espectro, restando el valor medio de la absorbancia del espectro a los valores de absorbancia de cada longitud de onda y dividiendo por la desviación estándar, *ecuación (3)*.

$$x'_n = \frac{x_n - \bar{x}}{s} \quad (3)$$

Se utiliza principalmente para corregir variaciones sistemáticas de línea base producida por la dispersión.

1.7.4.4 Derivadas

Es uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopia MIR por su capacidad de minimizar los problemas característicos de esta técnica tales como el solapamiento de bandas y los desplazamientos de línea base. Los valores de la señal analítica se ajustan a

una función polinómica, estimando en cada caso los parámetros ajustables (los coeficientes de los términos polinómicos). Por ejemplo:

$$y = ax^3 + bx^2 + cx + d \quad (4)$$

donde a, b, c, d son los parámetros ajustables, x representa la señal de longitud de onda en un espectro IR-TF y y la intensidad para nuestro caso.

La primera derivada elimina el efecto de las líneas base que varían a través de las muestras.

$$\frac{dy}{dx} = 3ax^2 + 2bx + c \quad (5)$$

La segunda derivada elimina señales de fondo (background) no lineales que varían de una muestra a otra⁷⁴.

$$\frac{d^2y}{dx^2} = 6ax + 2b \quad (6)$$

1.7.4.5 Corrección de Dispersión Multiplicativa (MSC, Multiplicative Scatter Correction):

Este método se utiliza para compensar efectos multiplicativos o aditivos debidos al *scattering* (dispersión). El MSC corrige los desplazamientos entre muestras aplicando a los espectros originales los parámetros de la recta, obtenida por mínimos cuadrados, representando los valores de absorbancia de un intervalo de longitudes de onda en el que no absorba el analito (aunque en la práctica se realiza con el espectro completo), frente a los valores de absorbancia de un espectro de referencia. La corrección del espectro original se reduce a:

$$x_i^{MSC} = \frac{x_i - a}{b} \quad (7)$$

donde a y b son los parámetros de la recta.

También existen otros pretratamientos que se utilizan para alinear las señales, generalmente son utilizados en RMN, ellos son: Co-shifting (Correlation Optimized shifting), COW (Correlation Optimized Warping), icoshift (interval-correlation-shifting).

1.7.5 Construcción del modelo

El modelo se construye a través de una herramienta quimiométrica escogida. En esta tesis se escogió PLS (mínimos cuadrados parciales), buscando relacionar un modelo que establezca la relación más simple y eficiente entre la propiedad a determinar (Concentración, Y) y la señal analítica (X).

En la construcción del modelo, se evalúan distintos parámetros implicados en el cálculo como el intervalo espectral, el pretratamiento espectral, muestras anómalas, número de componentes o factores, errores de calibración, entre otros.

1.7.5.1 PLS (Mínimos Cuadrados Parciales):

El método de mínimos cuadrados parciales (PLS, por partial least-squares) es un método de calibración inversa, el cual introduce los valores de las concentraciones de calibración en el cálculo de los factores. De esta manera, se crean factores dependientes de la concentración.

Existen dos tipos de métodos de PLS: uno denominado PLS-1, que concentra su atención en un único analito a la vez, y el otro llamado PLS-2, que permite calibrar y predecir las concentraciones de varios analitos simultáneamente. Así, PLS-1 debe repetirse para cada analito de interés, insumiendo más tiempo de cálculo. Pero, por otro lado PLS-1 permite optimizar las condiciones de trabajo para cada analito independientemente, lo que representa una gran ventaja. Para la mayoría de aplicaciones actuales, se prefiere PLS-1, que en adelante se llamará simplemente PLS⁷⁴.

Desde el punto de vista matemático, la calibración directa implica la medida de espectros de calibración en la matriz X , con concentraciones de los analitos contenidos en la matriz

\mathbf{Y} , y obtención de la matriz de sensibilidades a partir de la ley “directa” o ley de Lambert-Beer, \mathbf{E} matriz de errores, por ajuste mediante mínimos cuadrados:

$$\mathbf{X} = \mathbf{S}\mathbf{Y}^T + \mathbf{E} \quad (8)$$

En cambio, en la calibración inversa se utiliza la ley de linealidad inversa:

$$\mathbf{y}_n = \mathbf{X}^T \mathbf{v}_n + \mathbf{e} \quad (9)$$

donde se supone la existencia de una proporcionalidad entre la concentración de un único componente n y la respuesta contenida en \mathbf{X} , a través de coeficientes de regresión \mathbf{v}_n que deberá obtenerse por mínimos cuadrados.

La matriz de datos espectrales \mathbf{X} ($M \times N$) se construye de la siguiente forma:

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1N} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2N} \\ \cdots & \cdots & \cdots & \cdots \\ x_{M1} & x_{M2} & \cdots & x_{MN} \end{bmatrix}$$

Se mide el espectro a M las longitudes de onda (λ , cm) o número de onda ($\bar{\nu}$, cm^{-1}) o desplazamiento químico (δ , ppm) como ejemplos para esta tesis, de un conjunto de muestras N , donde cada vector espectral se agrupa en una matriz \mathbf{X} de dimensiones ($M \times N$).

En el método PLS se descompone la matriz \mathbf{X} en dos matrices (\mathbf{W} y \mathbf{P}), que contiene dos clases de factores espectrales o variables latentes: unos llamados “weight loading factors”, contenidos en la matriz \mathbf{W} , y otros llamados simplemente “loading” o “cargas”, contenidos en la matriz \mathbf{P} . Las columnas de \mathbf{W} son ortogonales, mientras que las de \mathbf{P} no necesariamente lo son. Es importantes recalcar que las columnas de \mathbf{W} no son autovectores propiamente dichos, sino factores que dependen de las concentraciones de calibración del analito de interés. La obtención de estos factores se lleva a cabo mediante un algoritmo iterativo cíclico, que puede resumirse en los siguientes pasos:

Paso 1)

Se proyecta la matriz de datos \mathbf{X} en el vector de concentraciones \mathbf{y}_n , obteniéndose el primer “weight loading factors”, que luego se normaliza a longitud unitaria:

$$\mathbf{w}_1 = \mathbf{X}\mathbf{y}_n / (\mathbf{y}_n^T \mathbf{y}_n) \quad (10)$$

En este paso del algoritmo, se supone que sólo se conocen las concentraciones de un único componente en las mezclas de calibración, en este caso el analito 1. En otras palabras, \mathbf{w}_1 es una aproximación por mínimos cuadrados al espectro puro del analito 1. En este paso se aprecia la introducción de información concerniente a las concentraciones contenidas en \mathbf{y}_n en el cálculo del primer factor.

Paso 2)

Se obtiene el primer “score” o “puntuación”:

$$\mathbf{t}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{w}_1 \quad (11)$$

Se continua con la suposición de que únicamente está presente el analito 1, y se calcula qué contribución del primer factor \mathbf{w}_1 está presente en las mezclas de calibración. Estas “concentraciones” forman al vector \mathbf{t}_1 .

Paso 3)

Se obtiene el primer coeficiente de regresión \mathbf{v}_1 :

$$\mathbf{v}_1 = \mathbf{t}_1 \mathbf{y}_n / (\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1) \quad (12)$$

Se calcula el coeficiente de regresión que relaciona el “score” \mathbf{t}_1 . calculado en el paso 2) con las calibraciones de concentración.

Paso 4)

Se obtiene el primer “loading” \mathbf{p}_1 :

$$\mathbf{p}_1 = \mathbf{X}^T \mathbf{t}_1 / (\mathbf{t}_1^T \mathbf{t}_1) \quad (13)$$

Paso 5)

Se calculan los residuos espectrales y de concentración:

$$\mathbf{e}_X^T = \mathbf{X}^T - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T \quad (14)$$

$$\mathbf{e}_y = \mathbf{y}_n - \mathbf{v}_1 \mathbf{t}_1 \quad (15)$$

En los pasos 4 y 5) se asegura que los vectores \mathbf{t}_a y \mathbf{w}_a subsiguientes serán ortogonales entre sí. Para ello se calculan los vectores \mathbf{p}_a , llamados “loadings”. Estos vectores, no explican la varianza espectral en la matriz X, sino que representan un intento de explicar dicha varianza, mientras simultáneamente se correlacionan los “scores” \mathbf{t}_a con las concentraciones \mathbf{y}_n .

Paso 6)

Se sustituyen \mathbf{e}_X y \mathbf{e}_y por \mathbf{X} y \mathbf{y}_n respectivamente en el paso 1) y se continua hasta llegar al número de factores deseados A.

Calibración

La etapa de calibración requiere estimar en primer lugar el número óptimo de factores A, lo que usualmente se lleva a cabo mediante la técnica de validación cruzada. El resultado de la calibración es la obtención del vector de coeficientes de regresión \mathbf{v}_n , cuyos elementos ($\mathbf{v}_1, \dots, \mathbf{v}_A$) se obtienen en cada uno de los A pasos del algoritmo cíclico anterior.

1.7.5.2 Número óptimo de factores (A):

Se repite el algoritmo cíclico tantas veces como la mitad del número de mezclas más uno (I:2+1). En cada ciclo se obtienen los parámetros correspondientes ($\mathbf{w}_i, \mathbf{t}_i$) y con ellos se

realiza una validación cruzada (*cross validation*). Este método consiste en calibrar todas las muestras de calibración menos una, con este nuevo juego de calibración se predice la concentración de la muestra que fue dejada de lado; luego se repite dejando de lado otra de las muestras de calibración y así sucesivamente hasta que todas fueron dejadas de lado.

Con las concentraciones predichas y las concentraciones nominales se calcula el error a través de un estadístico llamado PRESS (del inglés, Sum of Squares Prediction Error)⁷⁴.

$$PRESS = \sum (C_{nom} - C_{pred})^2 \quad (16)$$

donde C_{nom} es la concentración nominal del componente en las mezclas utilizadas para la calibración, y C_{pred} es la concentración predicha por el modelo.

Esquemáticamente:

para A=1, se calcula PRESS₁

para A=2, se calcula PRESS₂

.

.

.

para A=I:2+1, se calcula PRESS_{I:2+1}

El número óptimo de factores correspondería al que tiene menor PRESS, aunque no siempre el número de factores que corresponde al menor PRESS es el más indicado para la predicción. La mejor manera de seleccionar el número de factores es a través del estadístico F, que es el cociente entre cada uno de los errores calculados (PRESS_i) y el menor error obtenido (PRESS_{menor}), para i=1, 2, ...I:2+1⁷⁵, ver *ecuación (17)*.

$$F_i = \frac{PRESS_i}{PRESS_{menor}} \quad (17)$$

El número óptimo de factores corresponderá al primer F_i , cuya probabilidad sea menor que 0,75. En la *Figura 7*, puede visualizarse que el menor PRESS corresponde a $A=3$, pero para $A=2$ se cumple que la probabilidad de F_2 es menor de 0,75, por lo que el número de factores que se elige es 2.

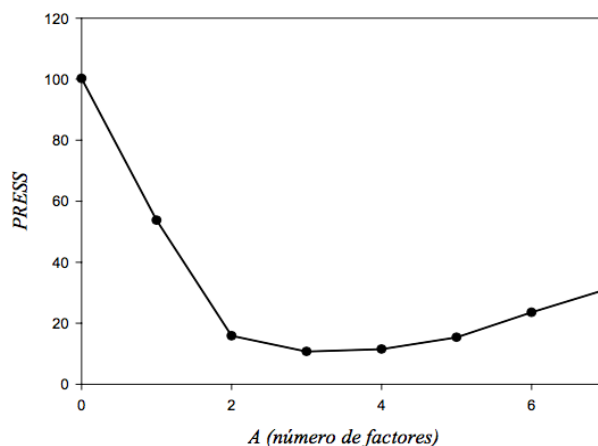


Figura 7: PRESS versus A.

1.7.5.3 Parámetros estadísticos indicadores de la calidad del ajuste:

Para evaluar la calidad de la calibración, una vez elegido A, puede calcularse parámetros estadísticos entre los que se pueden mencionar:

- PRESS: Corresponde a la suma de cuadrados de los errores en las concentraciones predichas. Este parámetro ya fue descrito anteriormente, *ecuación (16)*.
- RMSECV (del inglés, *Root Mean Square Error of Cross Validation*), también llamado SEP, que como puede observarse tiene las mismas características de una desviación estándar.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{1}{I} \sum_{i=1}^I (C_{nom} - C_{pred})^2} \quad (18)$$

donde C_{nom} es la concentración nominal del componente en las I mezclas de calibración, C_{pred} es la concentración predicha por el modelo.

c) REP (del inglés, *Relative Error Prediction*) error estándar de la predicción.

$$REP \% = \frac{100}{\bar{c}} \sqrt{\frac{1}{I} \sum_{i=1}^I (C_{nom} - C_{pred})^2} \quad (29)$$

donde C_{nom} y C_{pred} corresponden a la definición anterior y \bar{c} es la concentración promedio de las mezclas de calibración.

d) R^2 (Coeficiente de correlación al cuadrado), que es un indicador de la calidad del ajuste, ya que indica el grado de correlación entre las concentraciones agregadas y las predicas:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^I (C_{nom} - C_{pred})^2}{\sum_{i=1}^I (C_{nom} - \bar{c})^2} \quad (20)$$

Es común que se definan estadísticos similares relacionando las concentraciones predichas en muestras usadas para validar modelos. Así se pueden calcular $RMSE_{pred}$, REP_{pred} y R^2_{pred} .

1.7.6 Validación del modelo

La validación consiste en el análisis de un grupo de muestras independientes al utilizado en calibración. De esta manera se verifica que el modelo construido constituye una correcta descripción del conjunto de datos experimentales. Si los resultados no son satisfactorios el modelo se tiene que volver a recalcular.

1.7.7 Predicción en nuevas muestras

En la etapa de predicción se emplean los coeficientes de regresión para estimar la concentración del analito en la muestra. El paso previo es la obtención de los “scores” de la muestra, lo que se realiza con ayuda de las matrices **W** y **P**:

$$\mathbf{t}_A = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \mathbf{x} \quad (21)$$

$$\mathbf{y}_n = (\mathbf{v}_n)^T \mathbf{t}_A \quad (22)$$

1.7.8 Ventajas y desventajas

Una ventaja de la calibración multivariante mediante regresión PLS es la eficiencia en recolección de los datos, compresión de la información, manipulación de la muestra y conocimiento de los resultados, de ahí la popularidad de la aplicación de modelos matemáticos a los problemas químicos³⁹.

Utiliza una calibración inversa, lo que permite calibrar con mezclas que contengan los posibles componentes de las incógnitas, pero en las que solo se requiere conocer las concentraciones de un único componente. Resuelve colinealidades espectrales, a través del uso de factores ortogonales. Utiliza los espectros completos. Y como desventaja es sensible a interferencias no modeladas.

1.7.9 Aplicaciones de la calibración multivariante

Haciendo un contraste de los trabajos anteriormente mencionados de Gallardo-Velázquez *et al.*⁵¹ en filetes de pescado y el de Maggio *et al.*⁵³ en aceite de oliva, se puede concluir que en ambos obtuvieron buenos modelos de calibración con PLS para la cuantificación de ácidos grasos individualmente, sin embargo, Gallardo-Velázquez *et al.*⁵¹, exploraron diferentes tipos de pretratamiento (primera y segunda derivada, SNV, MSC) a los datos espectrales y así pudieron construir el modelo de calibración con datos más homogéneos, mientras que Maggio, *et al.*⁵³, solo utilizaron primera derivada como pretratamiento de los datos y no exploraron otros.

Sobre la construcción del modelo de Gallardo-Velázquez, *et al.*⁵¹, utilizaron 84 muestras para construir el modelo de calibración y validación, es decir, no utilizaron un set independiente de muestras para realizar la validación del modelo (25% del total de

muestras recomendado), haciendo que haya un sesgo muestral y posiblemente algunas conclusiones propuestas por los autores pueden ser erróneas; para este proyecto se desea evitar lo mencionado y poder utilizar un 75% de las muestras para la calibración y un 25% de muestras para la validación. Maggio, *et al.*⁵³, utilizaron un set de 25 muestras de ochenta y seis, para la validación del modelo y el resto de muestras para la calibración.

1.8 Cepa Carménère

Una vez construidos y validados con mosto sintético y mostos en fermentación se desea aplicar estos modelos en mosto de la cepa *Carménère* para poder predecir las concentraciones desconocidas de ácidos grasos de cadena media e insaturados y α -aminoácidos.

Poder tener estos modelos de calibración para cada analito, es particularmente relevante para la variedad *Carménère*, que en 1994 fue redescubierta en Chile, y que hasta la fecha se había confundido con la variedad *Merlot*. En la actualidad, la producción de vino *Carménère* está enfocada a desarrollarse como una variedad emblemática de Chile a nivel internacional. Por lo tanto, se necesitan metodologías analíticas para caracterizar esta variedad y diferenciarla de las otras producidas en el país, y más importante aún, para aumentar el conocimiento acerca de esta cepa mediante la investigación y poder aplicarse en la resolución de problemas que se presentan en la industria.

Dados los antecedentes informados anteriormente, esta investigación desarrolló dos metodologías analíticas para determinar el contenido de ácidos grasos y α -aminoácidos que pueden ser variables críticas durante la fermentación alcohólica del vino, capaces de proveer la información con alta precisión en las medidas, en base a técnicas espectroscópicas de Infrarrojo con Transformada de Fourier y la Resonancia Magnética Nuclear de alta resolución en combinación con las herramientas quimiométrica de calibración multivariante PLS.

CAPÍTULO 2

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

El uso de la metodología analítica basada en IR-TF y GC en combinación con PLS permitirá cuantificar los ácidos grasos de cadena media ($C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico) y cadena larga insaturados ($C_{14:1}$ miristoleico, $C_{16:1}$ palmitoleico, $C_{18:1}$ oleico, $C_{18:2}$ linoléico, $C_{18:3}$ linolénico) de una matriz compleja como es el mosto de uva durante la fermentación alcohólica.

El uso de la metodología analítica basada en RMN y HPLC en combinación con PLS permitirá cuantificar los α -aminoácidos (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina y L-prolina) de una matriz compleja como es el mosto de uva durante la fermentación alcohólica.

2.2 Objetivo general

En virtud de los antecedentes presentados se plantea como objetivo general de esta tesis:

“Desarrollar metodologías analíticas para determinar el contenido de ácidos grasos y α -aminoácidos durante la fermentación alcohólica del vino utilizando espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (IR-TF) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución en combinación con métodos quimiométricos de calibración multivariante”.

2.3 Objetivos específicos

- a)* Identificar y cuantificar el contenido de ácidos grasos de cadena media ($C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico) y cadena larga insaturados ($C_{14:1}$ miristoleico, $C_{16:1}$ palmitoleico, $C_{18:1}$ oleico, $C_{18:2}$ linoléico, $C_{18:3}$ linolénico) en mostos implementando y validando la técnica GC-FID.
- b)* Identificar los ácidos grasos de cadena media y cadena larga insaturados mediante espectroscopia IR-TF en el rango medio (MIR) en mostos.
- c)* Desarrollar los modelos de calibración y validación con la herramienta quimiométrica PLS, basados en medidas de IR-TF y GC-FID, para cuantificar el contenido de cada ácido graso de cadena media ($C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico) e insaturados ($C_{14:1}$ miristoleico, $C_{16:1}$ palmitoleico, $C_{18:1}$ oleico, $C_{18:2}$ linoléico, $C_{18:3}$ linolénico) en mostos.
- d)* Identificar y cuantificar el contenido de α -aminoácidos (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina y L-prolina) en mostos en fermentación implementando y validando la técnica HPLC-UV.
- e)* Identificar los α -aminoácidos (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina y L-prolina) mediante espectroscopia RMN de alta resolución en mostos.
- f)* Desarrollar los modelos de calibración y validación con la herramienta quimiométrica PLS, basados en medidas de RMN y HPLC-UV, para cuantificar el contenido de cada α -aminoácido (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina) en mostos.

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

En este capítulo se describen las estrategias para desarrollar dos nuevas metodologías analíticas propuestas en esta tesis doctoral, las cuales permitieron cuantificar:

- En primer lugar, el contenido de MCFA y de LCUFA con el método de referencia GC-FID. Esta cuantificación se realizó para el mosto real (fermentaciones normales y problemáticas del vino Carménère). Adicionalmente, por medio de la espectroscopia IR-TF se tomaron espectros a las mismas muestras de mosto real y un set de mosto sintético de concentraciones conocidas.

Luego de obtener los datos de referencia junto con los datos de los espectros, se desarrollaron modelos de calibración y validación utilizando la herramienta quimiométrica (PLS), por último, se realizó la predicción de las concentraciones de los ácidos grasos con un set diferente de muestras.

- En segundo lugar, el contenido de **α -aminoácidos** con el método de referencia HPLC-UV. Esta cuantificación se realizó para el mosto real (fermentaciones normales del vino Carménère). Posteriormente, por medio de la espectroscopia RMN de alta resolución se tomaron espectros a las mismas muestras de mosto real.

Luego de obtener los datos de referencia junto con los datos de los espectros, se desarrollaron modelos de calibración y validación utilizando PLS.

Finalmente, se realizó la predicción de las concentraciones de los aminoácidos con un set diferente de muestras, ver *Figura 8*.

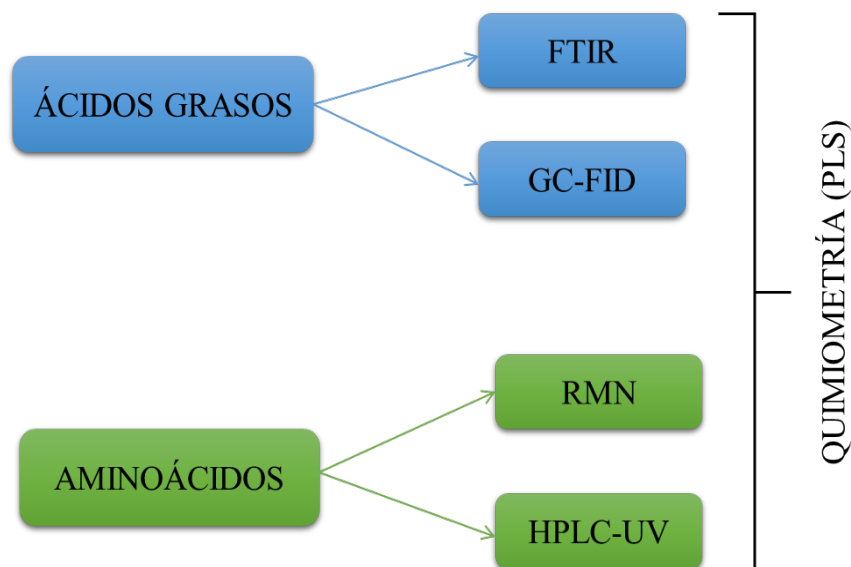


Figura 8: Esquema de metodologías utilizadas.

3. Procedimiento experimental

3.1 Equipos e instrumentos

Para el desarrollo de las fermentaciones del mosto *Carménère* se utilizaron fermentadores de 4 litros (escala de laboratorio), con control de temperatura, pH y agitación.

Para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos se utilizó un cromatógrafo gaseoso (GC) Hewlett Packard, modelo No. 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), acoplado a un detector de ionización de llama (FID).

El cromatógrafo se encontraba equipado con un inyector automático y software ChemStation. La columna capilar fue DB-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) de Agilent J&W.

Para el tratamiento de muestra de los ácidos grasos se utilizaron: Centrifuga HERMLE marca Z323K, rota-vapor marca BÜCHI modelo R-2, baño maría (Mettler, Schwabach, Germany), vortex FINE PCR.

Los espectros se tomaron en el IR-TF Alpha Wine de marca Bruker Optics, con módulo ATR (Attenuated Total Reflection) y control de temperatura. Software OPUS (Versión 2012).

Para secar las muestras se utilizó una bomba de vacío con trampa de líquido POBEL. Se utilizó una microcentrífuga marca PRISM (Labnet International, Inc.).

Para la identificación y cuantificación de los aminoácidos se utilizó un HPLC-UV con software EzChrom Elite Manager. La columna fue una Nova-Pak C18 (Waters) (4 μm x 3,9 mm x 300 mm).

Para el registro y procesamiento de espectros se utilizó el RMN Bruker Avance de 400 MHz con software TOPSPIN (versión 2.1).

3.2 Preparación de mosto sintético

La preparación del mosto sintético fue basado en el estudio realizado por Salmon *et al.*⁷⁶. Se prepararon doce mezclas en agua destilada con los analitos de interés (aminoácidos y ácidos grasos) y las interferencias conocidas (glucosa, ácidos orgánicos, cloruro de amonio y alcoholes) como se describe en la *Tabla 12*.

Las doce mezclas abarcaron los rangos de concentración en que se encuentran esas sustancias en un mosto en fermentación. La mezcla 1, simula las concentraciones de un mosto en el inicio de su fermentación y la mezcla 12, en el final de la fermentación.

3.3 Preparación de fermentaciones con mosto real (Carménère)

Las fermentaciones fueron realizadas en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Técnica Federico Santa María. El mosto utilizado para el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas a escala de laboratorio fue de vino tinto de la cepa *Carménère* proveniente de la región del Maule. Para el seguimiento de las fermentaciones se siguió el protocolo de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), ver *Anexo 1*.

Durante todas las fermentaciones, se tomaron 200 mL de muestra de cada fermentador a intervalos de 12 h para el conteo de levaduras viables, biomasa, densidad, concentración de SO_2 libre y total, azúcares reductores, acidez total¹, pH y nitrógeno fácilmente

asimilable⁷⁷. El recuento de levadura viable se llevó a cabo inmediatamente después de la toma de muestra.

Tabla 12: Concentraciones (mg/L) en mosto sintético⁷⁶.

Concentraciones (mg/L)		Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7	Mezcla 8	Mezcla 9	Mezcla 10	Mezcla 11	Mezcla 12
Azúcar	Glucosa	150000	120000	115000	90000	60000	50000	40000	25000	12000	5000	1000	50
	Ácido Cítrico	130	30	500	1000	1500	2000	2100	1200	2300	2400	2500	2500
Ac. Orgánicos	Ácido DL-Málico	1500	1500	1300	1000	40	140	600	1200	1500	3000	2500	2000
	Ácido Tartárico	5500	6000	5000	4500	4000	3500	3000	2500	50	500	2000	1500
	Ácido Succínico	50	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000	1500
	Ácido Láctico	450	200	10	50	100	500	500	1000	1500	2000	2500	3000
	Ácido Acético	5	5	50	50	100	100	1000	500	500	1000	1500	1500
	Cloruro de Amonio	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55	55
Aminoácidos	L.Prolina	9	160	320	480	640	800	960	1120	1280	1440	1600	1840
	L-glutamina	10	10	1	1	5	5	130	130	40	40	90	90
	L-Arginina	400	350	300	250	200	150	130	90	40	15	5	2
	L-Alanina	27	21	15	9	2	33	39	45	51	57	63	70
	Ácido L-Glutámico	1	7	14	21	28	36	43	50	57	64	71	85
Ac. Grasos	C6:0	1,2	0,4	2,2	3,2	4,2	7,2	6,2	5,2	8,2	9,2	10,2	12
	C8:0	0,5	0,5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	C10:0	0,2	2,2	4,2	6,2	8,2	10,2	12,2	14,2	16,2	18,2	20,2	22,2
	C12:0	0,5	1,1	3,1	0,5	5,1	7,1	9,1	10,1	12,1	14,1	15,1	16
	C14:1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4
	C16:1	0,5	1,5	2,1	2,8	8,5	3,5	4,2	4,9	5,6	6,3	7	7,7
	C18:1	0,5	1,1	2,2	3,3	5,5	6,6	8,8	9,9	10,1	11,2	12,3	13,4
	C18:2	0,2	3,6	7,2	10,8	14,4	18	21,6	25,2	43	28,8	32,4	36
	C18:3	0,3	0,6	1,2	1,8	2,4	3	3,6	4,2	4,8	5,4	6	7,5
Alcoholes	Glicerol	10	50	100	500	1500	3500	5500	8500	10000	14000	18000	21000
	Etanol (% v/v)	0	0,5	1	2,5	3	6	12	16	17	17,5	18	21

El resto de muestra (100 mL) se almacenó en tubos falcon y congeló a -22 °C (aproximadamente 2-3 meses) para su posterior análisis por GC-FID y HPLC-UV.

El proceso de descongelación de las muestras fue gradual: Se sacan del congelador (-22 °C) y se llevan al refrigerador a 2 °C por 12 horas, luego, se retiran del refrigerador y se

dejan a temperatura ambiente por 4 horas antes de proceder con los tratamientos de muestra.

Se realizaron ocho fermentaciones con mosto real a condiciones normales de operación con una temperatura de 28 °C; pH= 3,45; saturación de oxígeno inicial por 15 minutos; azúcar inicial 227 g/L; nitrógeno fácilmente asimilable (FAN) a 250 mg/L (ver *Tabla 13*, nivel normal (0)) y con una frecuencia de muestreo cada 24 horas (t= 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h). Se emplearon 4 fermentadores en paralelo de capacidad aproximada 4L cada fermentador, como se muestra en la *Figura 9*.

Se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Lavin EC1118 (Lallemand, Canada) para el desarrollo de las fermentaciones; se considera como el inicio de la fermentación (t=0) cuando se inocula, es decir, cuando se le adiciona la levadura viva al mosto¹ (ver *Anexo 1*). La duración de las fermentaciones fue aproximadamente de 5-7 días y se dio por terminada cuando la concentración de azúcares residuales estuvo entre 2-4 g/L.

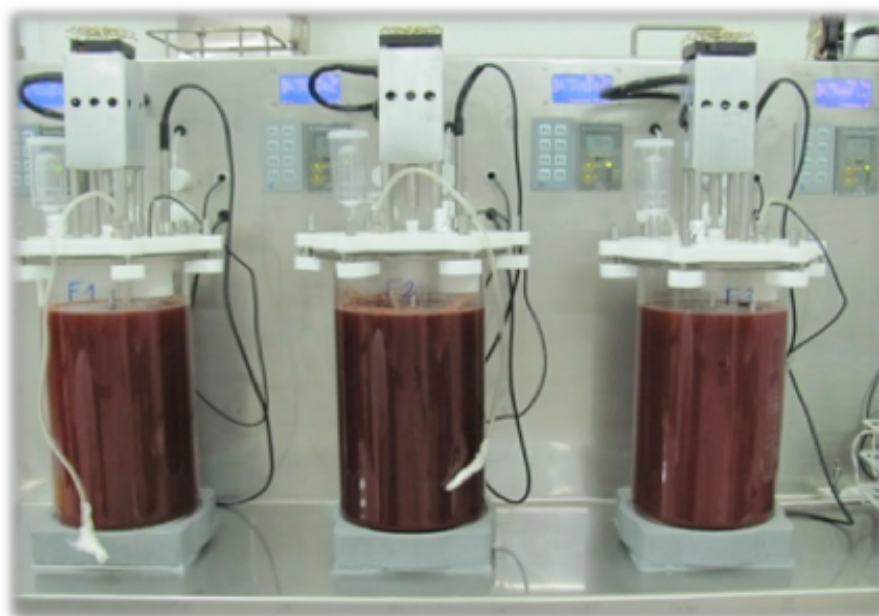


Figura 9: Fermentadores de 4 litros (escala de laboratorio), con control de temperatura, pH y agitación.

Se realizaron diecinueve fermentaciones más a escala de laboratorio (4 L), bajo las siguientes condiciones de operación (*Tablas 11 y 12*):

Nivel Carencia (-1): La concentración de oxígeno para este nivel es nula, en otras palabras, la fermentación se da totalmente anaerobia.

La temperatura en este nivel se encuentra cuatro grados por debajo (24 °C) respecto a la condición normal (28 °C).

Nivel Exceso (1): La concentración de oxígeno en este nivel es abundante, debido a que se realiza aireación por burbujeo dos veces por 15 min al inicio y al final de la fase exponencial.

La temperatura en este nivel se encuentra cuatro grados por encima (32 °C) respecto a la condición normal (28 °C).

La frecuencia de muestreo fue cada 24 horas. La duración de las fermentaciones fue entre 120-384 horas.

Tabla 13: Condiciones de operación para las fermentaciones del vino *Carménère*.

Variables	Carencia	Normal	Exceso
	-1	0	1
Concentración oxígeno (aire)*	Anaerobio	*Saturar al inicio 15 min.	*Saturar al inicio (15 min) y al final de la fase exponencial (15 min).
Temperatura	24 °C	28 °C	32 °C

*La saturación de oxígeno se realizó con burbujeo de aire a 9 mg/L por 15 min.

A continuación, se muestra en la *Tabla 14* el diseño de experimentos realizado para las fermentaciones de la N° 9 hasta la N° 27.

Se realizaron diferentes combinaciones de temperatura y oxigenación para los tres niveles (-1, 0, 1). Quedando cuatro fermentaciones a 24 °C, cuatro a 32 °C, cinco anaerobias y finalmente, cuatro con saturación al inicio y final de la fase exponencial (ver *Tabla 13*). Con estas fermentaciones se evaluó el efecto de la temperatura y oxigenación sobre los ácidos grasos.

Tabla 14: Diseño de experimentos: Nivel carencia (-1), nivel normal (0), nivel exceso (1).

Fermentación N°	Temperatura	Oxigenación
9	1	0
10	0	0
11	0	-1
12	0	0
13	-1	0
14	0	1
15	0	0
16	0	-1
17	1	-1
18	-1	1
19	0	-1
20	0	1
21	-1	0
22	1	0
23	1	0
24	0	-1
25	0	1
26	0	0
27	-1	0

3.4 Determinación de ácidos grasos

Se identificó cada ácido graso de interés por GC-FID (Método de referencia) y por IR-TF. Después, los datos de referencia junto con los espectros, se les aplicó la herramienta quimiométrica PLS para la construcción de los modelos de calibración y validación, posteriormente la predicción de la concentración de los analitos en mosto de la cepa *Carménère*.

3.4.1 Determinación del contenido de ácidos grasos por GC-FID

Los métodos analíticos usuales⁷⁸⁻⁸⁰ para ácidos grasos incluyen extracción, derivatización a metil ésteres, y cromatografía gaseosa⁸¹.

Se identificó y cuantificó el contenido de ácidos grasos (C_{6:0} caproico, C_{8:0} caprílico, C_{10:0} cáprico, C_{12:0} láurico, C_{14:1} miristoleico, C_{16:1} palmitoleico, C_{18:1} oleico, C_{18:2} linoléico, C_{18:3} linolénico) con el siguiente procedimiento:

3.4.1.1 Preparación de curva de calibración

Se prepararon en hexano los estándares de metil ésteres de ácidos grasos (FAMES mix 10 mg/mL de 37 componentes en cloruro de metileno de Sigma Aldrich (Bellefonte, PA) y el estándar interno (IS) nonanoato de metil C_{9:0} de alta pureza con concentración conocida proveniente de Sigma Aldrich (St. Louis, MO) los cuales se inyectaron en el cromatógrafo gaseoso para la identificación y cuantificación de los analitos de interés.

Se prepararon dos curvas de calibración, una con un nivel bajo-medio (5 puntos) y otra curva con un nivel medio-alto (5 puntos).

3.4.1.2 Tratamiento de la muestra

Etapa 1: Extracción Líquido-Líquido.

Los ácidos grasos fueron extraídos como se describe en Santamaría *et al.*¹³. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 10733 g. Se midieron 25,0 mL por muestra y se transfirieron a un embudo de separación de 50 mL y se adicionó el IS C_{9:0}. Se realizó dos veces la extracción líquido-líquido con 15 mL de cloroformo-metanol (2:1 v/v), la fase orgánica se destiló en rota-vapor hasta sequedad bajo presión reducida a 35 °C.

Cuando se realizaron recuperaciones de los analitos en la validación del método (exactitud), en el mismo paso de adición del IS, se adicionaron también los estándares externos (mix FAMES).

Etapa 2: Derivatización

Inmediatamente, el extracto seco fue saponificado con 1 mL de NaOH metanólico 0,5 N (ver mecanismo de reacción en la *Figura 10*), y transferido a tubos de vidrio de capacidad 8 mL los cuales se taparon y sellaron con papel parafina. Los tubos se colocaron en un baño maría a 70 °C durante 15 minutos y luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

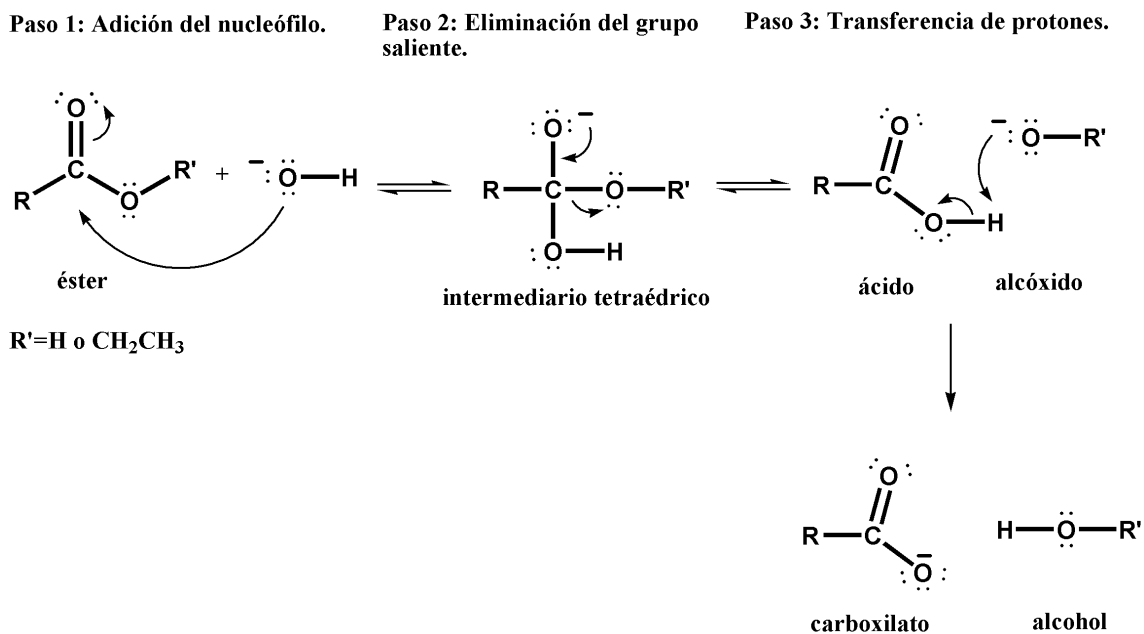
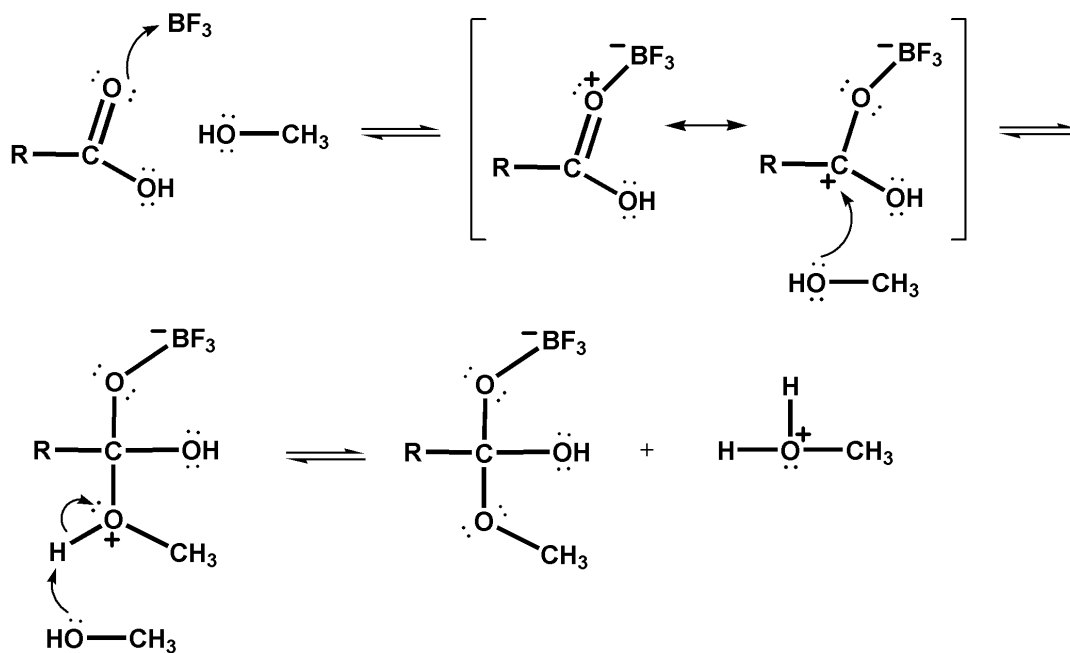


Figura 10: Mecanismo de reacción: Saponificación de un éster²⁷.

Posteriormente, los ácidos grasos fueron metilados con 1 mL de trifluoruro de boro metanólico (10% p/p) $BF_3/MeOH$ de Sigma Aldrich (Bellefonte, PA), ver mecanismo de reacción en la *Figura 11*. Nuevamente, los tubos se sellaron, taparon con papel parafina y puestos en baño de maría a $70\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos, luego, se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

A cada tubo se les adicionó 2 mL de una solución acuosa saturada de $NaCl$ y 1 mL de hexano. Se agitaron en el vortex durante 3 minutos, y la fase orgánica (hexano) fue transferida a viales para poder ser inyectados en el GC. Este procedimiento fue modificado del original¹³ y validado.

(1) Adición del alcohol al grupo carbonilo catalizada por un ácido.



(2) Deshidratación catalizada por un ácido.

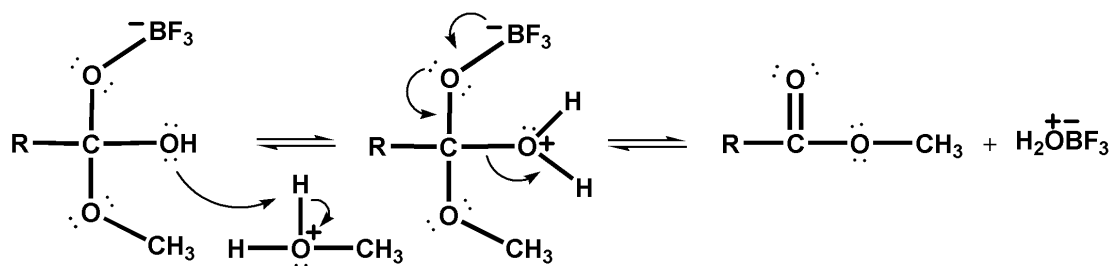


Figura 11: Mecanismo de reacción: Esterificación de Fisher. (1) Adición del alcohol al grupo carbonilo catalizada por un ácido. (2) Deshidratación catalizada por un ácido²⁷.

3.4.1.3 Determinación

Para cuantificar los analitos en mosto real de la cepa *Carménère*, se inyectaron 2 μ L del extracto derivatizado concentrado, y estándar FAMES en el Cromatógrafo Gaseoso con detector FID, las condiciones de optimización cromatográficas fueron las descritas en la *Tabla 15*.

Tabla 15: Condiciones cromatográficas para método GC-FID.

Gas de arrastre:	Helio
Columna capilar:	DB-WAX (30m x 0,25mm x 0,25µm) fase polietilenglicol (altamente polar).
Flujo de columna:	1,7 mL /min
Flujo H₂:	40 mL/min
Flujo Aire:	400 mL/min
Flujo Makeup:	30 mL/min
Temperatura del inyector:	250 °C
Modo de inyección:	Splitless
Rampa de temperatura del horno:	50 °C (2 minutos) 250 °C (8 minutos) a 10° C/min
Volumen de inyección:	2 µL
Temperatura del detector (FID):	280 °C
Tiempo de análisis:	29 minutos

La *Figura 12*, esquematiza todo el procedimiento para la cuantificación de los ácidos grasos de interés en esta investigación por cromatografía gaseosa.

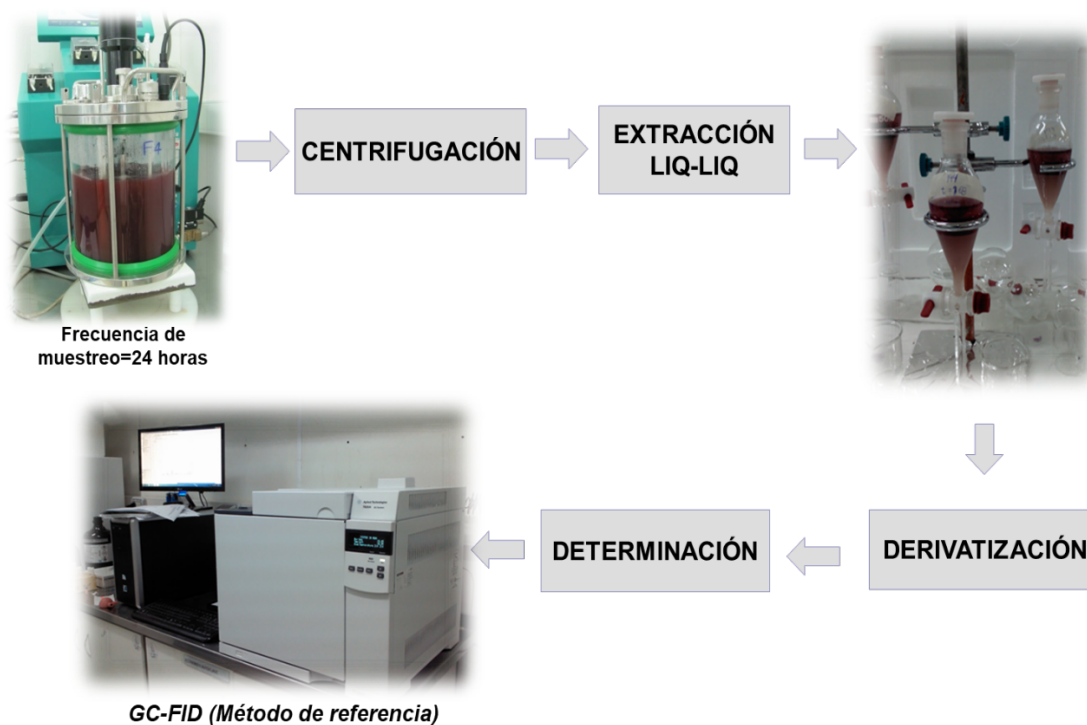


Figura 12: Esquema del procedimiento de cuantificación de ácidos grasos por GC-FID.

3.4.2 Determinación de ácidos grasos por IR-TF

3.4.2.1 Preparación de estándares

Se prepararon individualmente los estándares de ácidos grasos metilados ($C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico, $C_{14:1}$ miristoleico, $C_{16:1}$ palmitoleico, $C_{18:1}$ oleico, $C_{18:2}$ linoléico, $C_{18:3}$ linolénico) de alta pureza con concentración conocida en acetona, provenientes de Sigma Aldrich (Bellefonte, PA).

Para cada estándar se tomó un espectro donde se identificaron las bandas características de cada ácido graso de interés. Adicionalmente, se prepararon seis soluciones o puntos a diferente concentración en mg/L para cada uno de los analitos en acetona para la determinación del rango lineal, ver *Tabla 16*.

Tabla 16: Soluciones de ácidos grasos para la determinación de rango lineal.

Analitos	Concentraciones (mg/L)					
	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
$C_{6:0}$	0,1	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0
$C_{8:0}$	0,1	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
$C_{10:0}$	0,1	9,0	18,0	27,0	36,0	45,0
$C_{12:0}$	0,1	6,0	12,0	18,0	24,0	30,0
$C_{14:1}$	0,1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
$C_{16:1}$	0,1	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0
$C_{18:1}$	0,1	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0
$C_{18:2}$	0,1	14,0	28,0	42,0	56,0	70,0
$C_{18:3}$	0,1	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0

3.4.2.2 Tratamiento de la muestra

Se agitaron los tubos eppendorf que contiene aproximadamente 2 mL de muestra en un vortex para tratar de eliminar el CO_2 . Luego, se centrifugan a 10000 rpm por 5 min, ver *Figura 13*.

3.4.2.3 Determinación

Para cada muestra se tomaron espectros por duplicado o triplicado en el IR-TF con módulo de ATR (Reflectancia Total Atenuada) a una temperatura de 40 °C, en el rango espectral MIR (400 a 4000 cm^{-1}). Cada espectro obtenido es el resultado de 128 escaneos o barridos.

Para el mosto sintético y mosto real se tomaron espectros de dos formas, como muestra húmeda y como muestra seca.

- ☑ Muestra húmeda: La muestra se inyectó en su estado líquido, hasta que la sonda se llenó completamente y no quedaran burbujas.
- ☑ Muestra seca: Se puso 2 μL de muestra en el cristal, posteriormente con una bomba de vacío a presión 200 mmHg se secó el agua de la muestra por 2 min, se retiró el vacío para que las vibraciones no interfieran en la medida.

Se aseguró que el espectro al ser tomado tuviera una absorbancia mayor de 0,4 (este procedimiento fue estandarizado).

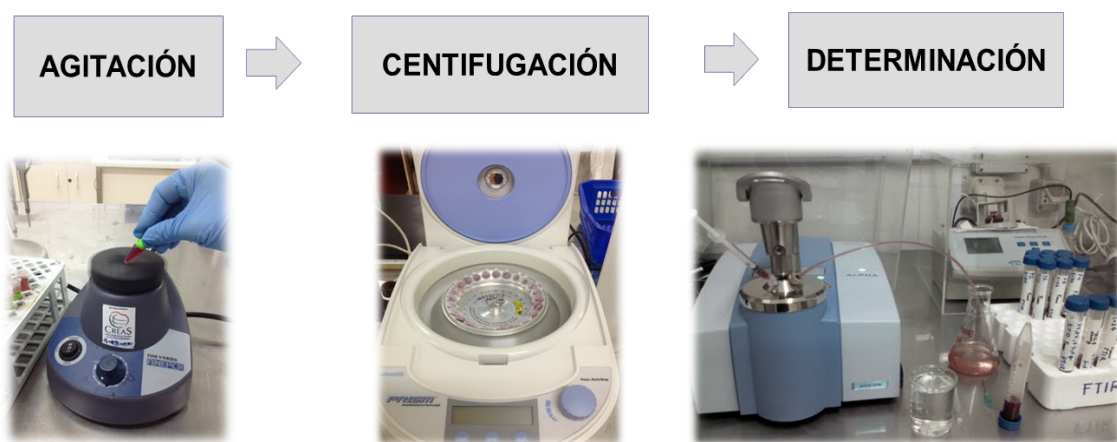


Figura 13: Esquema del procedimiento de determinación de ácidos grasos por IR-TF.

3.5 Determinación de aminoácidos

Se determinó cada α -aminoácido de interés por HPLC-UV (Método de referencia) y por ^1H RMN y ^{13}C RMN. Con la información obtenida se construyeron los modelos de calibración, validación y predicción de la concentración de los analitos en mosto de la cepa *Carmènère*.

3.5.1 Determinación del contenido de α -aminoácidos por HPLC-UV

Se identificó y cuantificó el contenido de Ac. L-glutámico, L-arginina, L-alanina y L-glutamina por cromatografía líquida de alta eficiencia como se describe en el siguiente procedimiento:

3.5.1.1 Preparación de estándares

Se prepararon en HCl 0,1 N estándares de α -aminoácidos (mix 18 componentes) y estándar interno (ácido L-2-aminoadípico de alta pureza con concentración conocida provenientes de Sigma Aldrich. Las soluciones fueron filtradas por membrana de PVDF (Polivinil Difluoruro) de 0,45 μm antes de la inyección en el HPLC.

3.5.1.2 Tratamiento de la muestra

Etapa 1: Derivatización

En un tubo de ensayo con tapa rosca, se mezcló 1,75 mL de tampón borato de sodio 1,0 M (pH=9), 750 μL de metanol, 0,5 mL de la muestra a analizar, 0,5 mL de agua desionizada, 20 μL de patrón interno (ácido L-2-aminoadípico) y 30 μL del agente derivatizante EMMDE (Etoximetilenmalonato de Dietilo)⁸², ver *Figuras 14 y 15*.

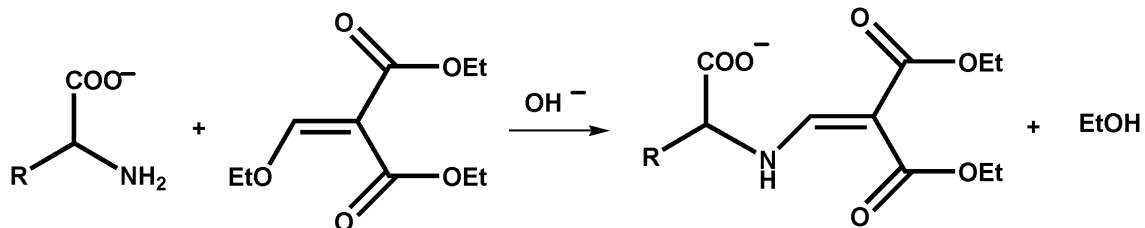


Figura 14: Reacción de derivatización esquemática para un aminoácido primario.

La reacción de derivatización se desarrolló durante 30 minutos en un baño de ultrasonido. La muestra se calentó por 2 horas a 70 °C para la completa degradación del exceso de EMMDE y de sus productos secundarios de degradación.

Adición 1,4 (Adición de Michael)

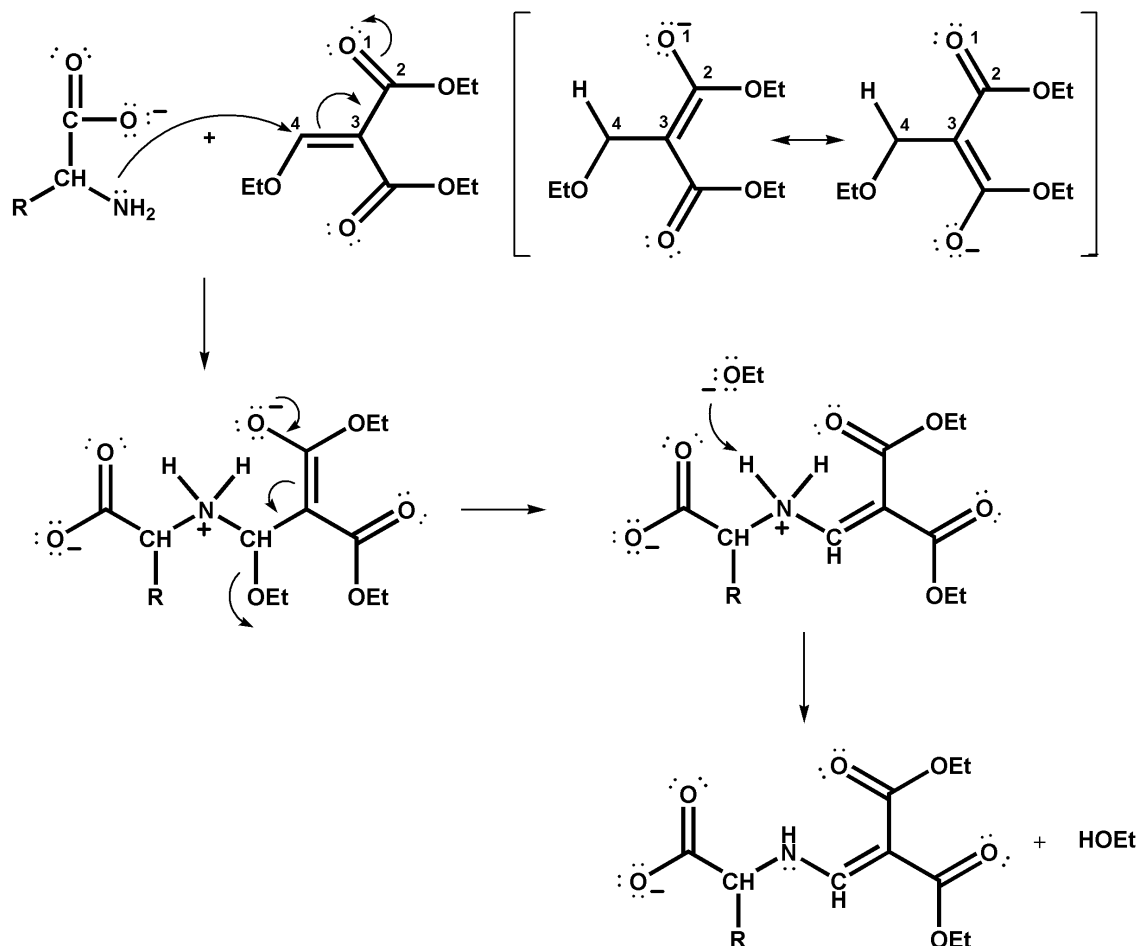


Figura 15: Mecanismo de reacción: Adición 1,4 (Adición de Michael).

Etapa 2: Filtración.

Se filtra cada muestra con una membrana de Polivinil Difluoruro (PVDF) de $0,45 \mu\text{m}$ ⁸². Todas las muestras de manera estándar fueron diluidas en la relación 1:1 con agua desionizada MiliQ.

3.5.1.3 Determinación

Las inyecciones de las muestras se realizaron en un HPLC-UV. La Optimización de condiciones cromatográficas se encuentran descritas en la *Tabla 17*.

Tabla 17: Condiciones cromatográficas para HPLC-UV⁸³.

Columna y precolumna	Nova-Pak (Waters) fase reversa C18 (4 μm x 3,9 mm x 300 mm)
Temperatura del horno	16 °C
Presión de la bomba	395 bares
Fase móvil	Fase móvil A: Tampón acetato [25mM, pH=5,8] + 0,02 % p/v azida sódica Fase móvil B: Acetonitrilo:Metanol (80:20)
Volumen de inyección:	50 μL
Longitud de onda UV	280 nm

La separación se llevó a cabo mediante el programa de elución mostrado en la *Tabla 18*. Por cada muestra, se necesitaron 29,2 mL de fase móvil A y 6,74 mL de fase móvil B, con un tiempo máximo de elución de 40 min. El protocolo original de Gómez-Alonso *et al.*⁸² fue modificado por Valderas⁸⁴, donde el tiempo de elución se prolonga por 5 minutos más.

Tabla 18: Programa de elución del método en HPLC-UV.

Tiempo (min)	Solución A (%)	Solución B (%)	Flujo (mL/min)
0	94	6	0,9
13	84	16	0,9
13,5	82	18	0,9
17	82	18	0,9
20	78	22	0,9
32	68	32	0,9
37	63	37	0,9

El procedimiento para la determinación de aminoácidos se esquematiza paso a paso en la *Figura 16*.

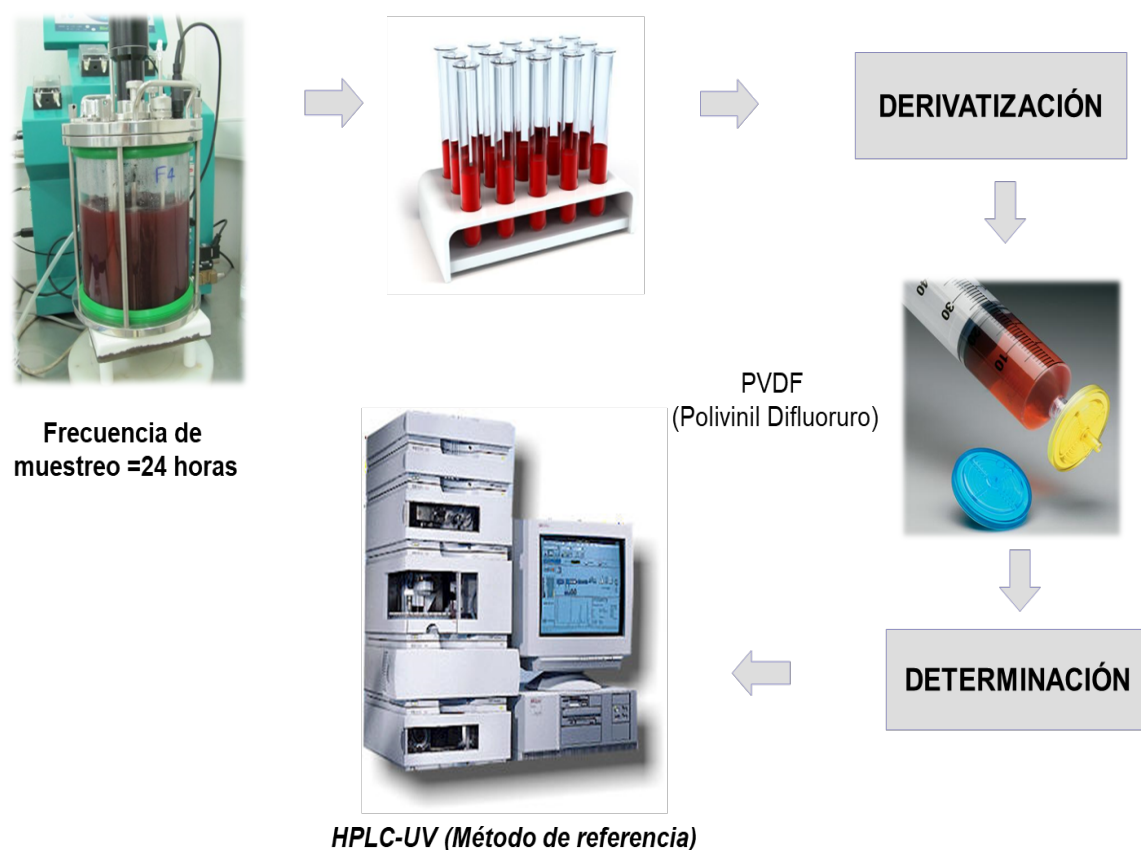


Figura 16: Esquema del procedimiento de cuantificación de aminoácidos por HPLC-UV.

3.5.2 Determinación de α -aminoácidos por RMN

Se identificaron las señales de ^1H RMN y ^{13}C RMN características de los aminoácidos: Ac. L-glutámico, L-arginina, L-alanina, L-glutamina y L-prolina, con el siguiente procedimiento descrito:

3.5.2.1 Preparación de estándares

Se prepararon en agua deuterada (D_2O) u oxido de deuterio al 99,9% cada uno de los estándares de α -aminoácidos libres de alta pureza provenientes de Merck. También se preparó el estándar interno ácido trimetilsilyl propianato de sodio (TSP) en agua deuterada al cual se le adicionó 200 μL de la solución madre a 1551 ppm, con éste se calibra cada espectro.

3.5.2.2 Tratamiento de la muestra

Todas las muestras fueron ajustadas a un $\text{pH}=3,45$. Se liofilizaron 10 mL de cada muestra a una temperatura de $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en tubos falcon de 50 mL. Luego, se adicionó 850 μL de agua deuterada (D_2O) más 150 μL de TSP a cada muestra⁶³.

Las muestras se filtraron con filtros de nylon de 0,45 μm , posteriormente, se pasaron a los tubos de 5 mm de RMN.

3.5.2.3 Determinación

El procedimiento para la determinación de los aminoácidos se esquematiza en la *Figura 17*.

Se tomaron espectros de ^1H RMN y ^{13}C RMN para cada estándar de α -aminoácido y muestras reales, con y sin ajuste de pH para corroborar si había desplazamiento químico.

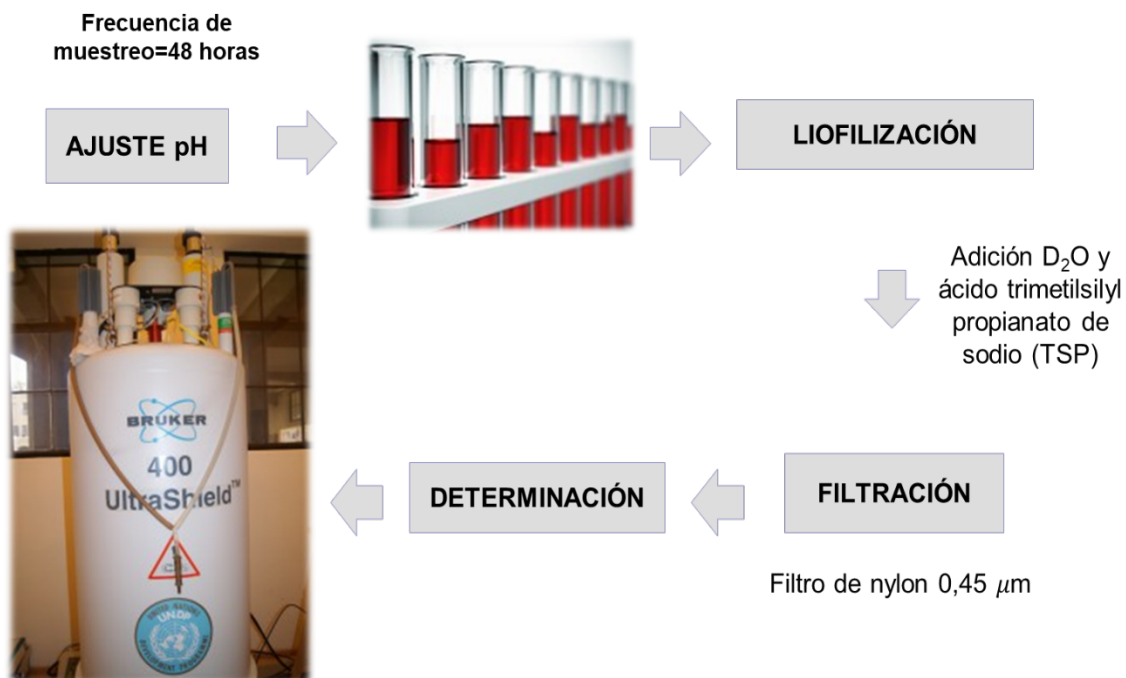


Figura 17: Esquema del procedimiento de determinación de aminoácidos por RMN.

Los experimentos que se consideraron para la **identificación** de cada α -aminoácido fueron:

- ✓ Experimento de ^1H RMN rutinario.
- ✓ Experimento de ^1H RMN con supresión de disolvente de pulso selectivo, con programa de pulsos basado en gradientes de campo magnético *zg0pr*.
- ✓ Experimento de ^{13}C RMN desacoplado de ^1H .
- ✓ Experimento de 1D ^1H RMN TOCSY de pulso selectivo, con programa de pulsos basado en gradientes de campo magnético *selmlgp*.

Los experimentos que se consideraron para la **cuantificación** basados en el estudio de Larsen *et al.*⁸⁵ son:

- ✓ Experimento de ^1H RMN rutinario.
- ✓ Experimento de ^1H RMN con supresión de disolvente de pulso selectivo, con programa de pulsos basado en gradientes de campo magnético *zg0pr*.

3.6 Desarrollo de modelos de calibración y validación.

3.6.1 Selección del conjunto de muestras

Para los modelos de calibración y validación con IR-TF y GC-FID se prepararon 12 soluciones de mosto sintético como se describe en la *Tabla 12*. Tanto para el mosto sintético y mosto real se tomaron espectros por duplicado en el equipo de IR-TF.

En los espectros se identificaron el eje y [la absorbancia] y en el eje x [el número de onda (cm^{-1})]. Es importante mencionar, que la información del eje y [absorbancia] se utiliza para la construcción de la matriz X .

Finalmente, se construyeron las matrices para ser procesadas en Matlab (plataforma MVC1-Calibración Multivariada de Primer Orden), construida por Olivieri *et al.*⁸⁶.

Y para los modelos de calibración y validación con RMN y HPLC-UV, solo se tuvieron en cuenta las fermentaciones reales, registrándose un espectro por cada muestra leída por ^1H RMN. En éstos se identificaron el eje y [intensidad] y en el eje x [desplazamiento químico (ppm)]. La información del eje y fue utilizada para la construcción de la matriz X , los datos del eje y se extrajeron con ayuda del software ACDlabs (versión 2008).

Luego, se construyeron las matrices donde fueron procesadas en Matlab (plataforma MVC1-Calibración Multivariada de Primer Orden), construida por Olivieri *et al.*⁸⁶.

3.6.2 Método de referencia

Los métodos de referencia son GC-FID para la cuantificación de los ácidos grasos y HPLC-UV para la cuantificación de los aminoácidos.

3.6.3 Obtención de la señal analítica

Para la obtención de la señal analítica las muestras se sometieron al procedimiento instrumental IR-TF(MIR) y ^1H RMN para determinar los ácidos grasos y aminoácidos

respectivamente. Luego se almacenó la información para la extracción y tratamiento de los datos (métodos de preprocesamiento).

3.6.4 Métodos de preprocesamiento de datos

Cuando se desea analizar varias muestras entre sí, es necesario que los datos sean lo más homogéneos posibles para construir un modelo, es por esto que se exploró varias herramientas de preprocesamiento de datos, utilizando la plataforma MVC1⁸⁶.

Para datos crudos espectrales IR-TF (Matriz X) se exploró con métodos de pretratamiento como: Primera y segunda derivada, SNV-Standard Normal Variate, MSC-Multiplicative Scatter Correction, centrado.

Para los espectros de ¹H RMN se calibraron con la señal de TSP (Trimetilsilyl propionato de sodio) como patrón interno de desplazamiento químico ($\delta=0$ ppm).

3.6.5 Construcción del modelo de calibración

Para la construcción de los modelos de calibración y validación para cada uno de los analitos, se utilizó la herramienta quimiométrica PLS (mínimos cuadrados parciales) usando la plataforma MVC1 dentro del programa Matlab (versión 2012a).

El comportamiento de la información espectral se pudo observar realizando una autopredicción, esto es lo primero que se evalúa para hacerse una idea de cómo van a resultar los modelos. Y como criterio de decisión si un modelo es adecuado el valor de RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) debe ser menor al 10% y el R² cercano a 1.

Luego, a un set de calibrado (75% de las muestras) se realiza validación cruzada (*cross validation*). Este procedimiento consiste en dejar una muestra fuera del set y utilizar el

resto de las muestras para calcular el modelo, repitiendo el proceso hasta que todas las muestras hayan sido excluidas, y predicha su propiedad a determinar.

Mediante la validación cruzada es posible estimar el RMSECV (*Root Mean Square Error of Cross Validation*). Las fórmulas de estos indicadores estadísticos se encuentran descritas en el *Capítulo 1*.

3.6.6 Validación del modelo

Se seleccionó el 25% del total de muestras de mosto real (set independiente) para la validación del modelo hallando errores de predicción como se describió en detalle en el *Capítulo 1*.

3.6.7 Predicción en muestras desconocidas

Por último, se prueba el modelo de calibración y validación con nuevas muestras de mosto real (cepa *Carmènère*) de concentraciones desconocidas, ver *Capítulo 1*.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se abordan los resultados de los análisis, caracterización y quimiometría de los ácidos grasos y aminoácidos considerando la metodología descrita en el *Capítulo 3*, orientados en los objetivos específicos de esta tesis.

4.1 Determinación de ácidos grasos

4.1.1 Validación del método cromatográfico GC-FID

La validación es el proceso mediante el cual se establece la evidencia documental de que un procedimiento analítico conducirá con un alto grado de seguridad en la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad establecidos por organizaciones internacionales de normalización^{87,88}.

Validar un método analítico es demostrar que los procedimientos de análisis realizados son adecuados para el fin que se proponen⁸⁹. En esta tesis se desarrolló y validó el método cromatográfico GC-FID para la identificación y cuantificación de los ácidos grasos de interés los cuales nunca se habían determinado en un proceso de fermentación alcohólica de la cepa *Carménère*.

La cuantificación de una sustancia puede variar de análisis a análisis, día a día, laboratorio a laboratorio, por esto el método cromatográfico seleccionado para la cuantificación debe poseer la mayor precisión y exactitud posible, repetitividad y un alto grado de reproducibilidad.

En la validación del método se determinan los siguientes parámetros:

- ✓ Selectividad y especificidad
- ✓ Límite de detección del método, LDM
- ✓ Límite de cuantificación del método, LQM
- ✓ Linealidad
- ✓ Rango

- ✓ Precisión (Repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad)
- ✓ Exactitud (Porcentaje de recuperación)
- ✓ Robustez

Para esta tesis determinamos las siguientes cifras de mérito: Selectividad, especificidad, LDM, LQM, linealidad, precisión (repetitividad) y exactitud (porcentajes de recuperación.)

4.1.1.1 Selectividad y especificidad

La selectividad hace referencia a la propiedad del método de dar respuesta clara y diferenciada para cada uno de los componentes de la muestra. Para efectuar dicho estudio, se precisó de la máxima información disponible suministrada en las referencias bibliográficas, optimización de condiciones de operación, utilización del estándar certificado FAMEs. Todo fue verificado experimentalmente, se pudo identificar claramente el pico cromatográfico de cada analito de interés, como se puede ver *Figura 18*. La especificidad es la propiedad por la cual la respuesta obtenida corresponde exclusivamente al compuesto que se desea detectar y cuantificar, libre de interferencias (impurezas) de otros componentes en la matriz de la muestra, en otras palabras, es únicamente el analito el responsable de la señal medida.

Para la demostración del alcance de la especificidad del método, se preparó un blanco de muestra y un blanco de reactivo, siguiendo todas las etapas del proceso analítico con la consiguiente utilización de todos los reactivos y disolventes que intervienen en el mismo y ausencia de analito. También se preparó un estándar certificado FAMEs que contiene todos los analitos de interés

El método se consideró específico cuando al analizar el blanco no hubo respuesta y al analizar el estándar certificado y las muestras solas, se pudo diferenciar claramente la respuesta del analito.

El método desarrollado en esta tesis es específico y selectivo.

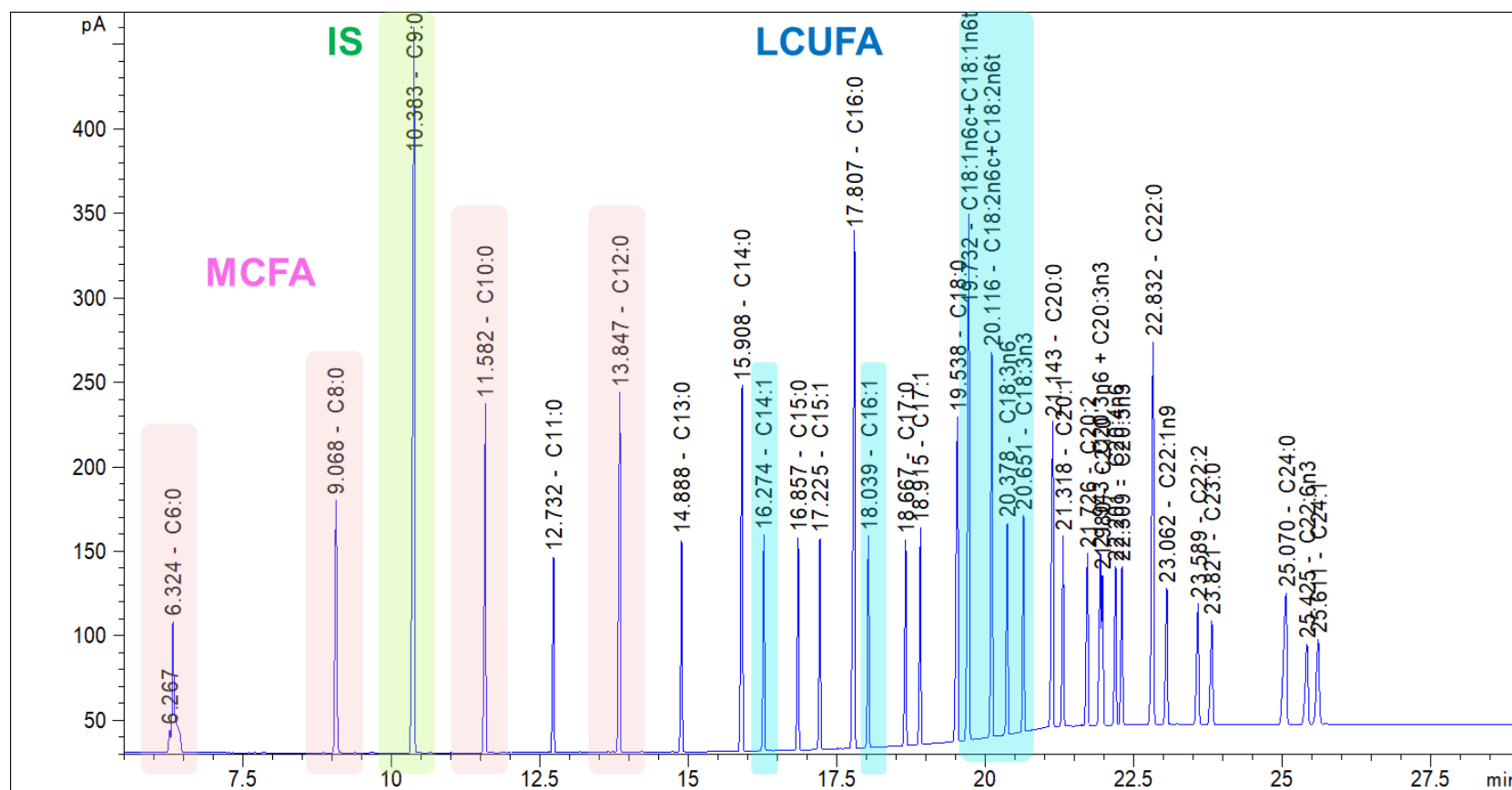


Figura 18: Identificación de ácidos grasos: Cromatograma del mix 37 componentes de FAMES por GC-FID. * t_r = 6,324 min (C_{6:0} caproico), t_r = 9,068 (C_{8:0} caprílico), t_r = 10,383 (C_{9:0} Estándar interno), t_r = 11,582 (C_{10:0} cáprico), t_r = 13,847 (C_{12:0} laúrico), t_r = 16,274 (C_{14:1} miristoleico), t_r = 18,039 (C_{16:1} palmitoleico), t_r = 19,732 (C_{18:1} oleico), t_r = 20,116 (C_{18:2} linoléico), t_r = 20,378+20,661 (C_{18:3} linolénico). * t_r : Tiempo de Retención.

4.1.1.2 Límite de detección del método

El límite de detección del método LDM, se puede describir como aquella concentración derivada de la medida más pequeña que proporciona una señal en el instrumento (y) significativamente diferente de la señal del blanco o ruido de fondo. Otra definición que se utiliza comúnmente en química analítica es que el límite de detección es la cantidad de concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más dos veces la desviación estándar del blanco, s_B . Organismos internacionales sugieren que el criterio debería ser⁹⁰:

$$y = 3s_B + y_B \quad (23)$$

Para la determinación del LDM, se calculó a través de la curva de calibración de rango bajo-medio. Se prepararon cinco niveles de concentración del estándar FAMEs, con los siguientes rangos para cada analito: C_{6:0} (1,30-10,38 mg/L), C_{8:0} (1,30-10,42 mg/L), C_{10:0} (1,30-10,41 mg/L), C_{12:0} (1,28-10,23 mg/L), C_{14:1} (0,65-5,21 mg/L), C_{16:1} (0,63-5,05 mg/L), C_{18:1} (1,93-15,43 mg/L), C_{18:2} (1,30-10,40 mg/L), C_{18:3} (0,65-5,26 mg/L).

Se supuso una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración (x), se construyó una recta de calibrado, ver *ecuación (24)*.

$$y = mx + b \quad (24)$$

donde m es la pendiente de la recta y b su ordenada en el origen (intercepto)⁹¹.

Despejando x de la *ecuación (24)* se tiene:

$$x = \frac{y - b}{m} \quad (25)$$

Reemplazando (23) en (25), se tiene:

$$x = \frac{(3s_B + y_B) - b}{m} \quad (26)$$

Un supuesto fundamental del método es que tiene una variación distribuida normalmente con una desviación estándar estimada por $s_{y/x}$. Por lo tanto, es apropiado utilizar $s_{y/x}$ en lugar de s_B en la estimación del límite de detección y el valor de b , la ordenada en el origen calculada puede utilizarse como una estimación de y_B ⁹⁰.

Se utiliza la *ecuación* (26) con los valores de y_B . (= b) y s_B (= $s_{y/x}$). El LDM viene dado por:

$$LDM = x = \frac{(3s_{y/x} + b) - b}{m} \quad (26)$$

La recta buscada se calcula basándose en el método de mínimos cuadrados, se utiliza para determinar la concentración en las muestras por interpolación y también para estimar el LDM calculando primero el estadístico $s_{y/x}$ que estima los errores aleatorios en la dirección y (error típico):

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (27)$$

Pendiente de la recta de mínimos cuadrados:

$$m = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (28)$$

Intercepto de la recta de mínimos cuadrados:

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (29)$$

Reemplazando los valores obtenidos por las ecuaciones (27), (28) y (29) en (26), se determina el LDM para cada analito de interés, los valores se encuentran en la *Tabla 19*.

4.1.1.3 Límite de cuantificación del método

El límite de cuantificación LQM, se define como la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con precisión bajo las condiciones experimentales establecidas y se ha sugerido como⁹⁰:

$$y = y_B + 10s_B \quad (30)$$

Por lo tanto, la ecuación para determinar el LQM viene dada por:

$$LQM = x = \frac{(10s_{y/x} + b) - b}{m} \quad (31)$$

Los valores del LQM para cada analito de interés en mg/L se encuentran en la *Tabla 19*.

Tabla 19: Resultados de algunas cifras de mérito. La linealidad (cinco niveles de concentración), coeficiente de determinación (R^2), límites de detección y cuantificación del método de una mezcla de FAMES de 37 componentes.

Ácido graso	Ecuación de regresión	R^2	LDM, mg/L	LQM, mg/L
C _{6:0}	$y = 0,2370x - 0,1642$	0,993	0,181	0,603
C _{8:0}	$y = 0,3640x - 0,1965$	0,994	0,159	0,531
C _{10:0}	$y = 0,4099x - 0,1794$	0,995	0,145	0,484
C _{12:0}	$y = 0,4648x - 0,2245$	0,9945	0,152	0,505
C _{14:1}	$y = 0,5123x - 0,1078$	0,994	0,171	0,571
C _{16:1}	$y = 0,5007x - 0,1108$	0,996	0,141	0,472
C _{18:1 n9(c+t)}	$y = 0,4969x - 0,3541$	0,9945	0,152	0,508
C _{18:2 n6(c+t)}	$y = 0,4910x - 0,2434$	0,995	0,147	0,491
C _{18:3 (6n+3n)}	$y = 0,4778x - 0,1124$	0,9945	0,153	0,512

4.1.1.4

4.1.1.4 Linealidad del método

La linealidad es la capacidad del método analítico para producir resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad de analito en un rango definido. Se determina mediante el tratamiento matemático de los resultados del análisis a diferentes concentraciones del analito.

Para la cuantificación de los analitos preparamos dos curvas de calibración, una con un rango bajo-medio de concentraciones que es la que se muestra en la *Tabla 19*, y la otra curva con un rango medio-alto de concentraciones.

Para la curva rango medio-alto, se prepararon cinco niveles de concentración del estándar FAMEs, con los siguientes rangos para cada analito: C_{6:0} (5,19-83,00 mg/L), C_{8:0} (5,21-83,38 mg/L), C_{10:0} (5,21-83,30 mg/L), C_{12:0} (5,12-81,84 mg/L), C_{14:1} (2,60-41,64 mg/L), C_{16:1} (2,52-40,36 mg/L), C_{18:1} (7,72-123,42 mg/L), C_{18:2} (5,19-83,12 mg/L), C_{18:3} (0,65-42,06 mg/L).

Uno de los criterios de aceptación para todas las curvas de calibración es que su coeficiente de determinación (R^2) sea mínimo $\geq 0,99^{92,93}$. Por lo tanto, como el valor obtenido fue superior en todas curvas de calibrado, indica que el sistema cumple con los requisitos de linealidad dentro del rango de trabajo.

Por otro lado, el test de linealidad arrojó que el coeficiente de variación de los factores de respuesta (C.V._f) para cada curva, estuvo por debajo del 5% recomendado para asegurar una calibración lineal.

El factor de respuesta F, se calcula como (Y/X), donde Y el área promedio, X concentración (mg/L) para este caso y el coeficiente de variación de los factores de respuesta como $CV_f = \sigma/\bar{X} * 100\%$, donde σ es la desviación típica y \bar{X} es la media.

4.1.1.5 Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones bien definidas.

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo. Esta variabilidad es debida a errores aleatorios inherentes a todo método de ensayo. Como consecuencia de la existencia de estos errores, los análisis efectuados sobre muestras idénticas, en las mismas circunstancias, no conducen generalmente a resultados idénticos. Los factores susceptibles de influir sobre los resultados de un ensayo no pueden ser siempre controlados (analista, equipo instrumental, reactivos, tiempo, etc.) de aquí la importancia del estudio de la precisión. La precisión es una medida del grado de separación o dispersión entre las medidas realizadas empleando un método analítico y trabajando en condiciones normales de operación. Se expresa normalmente como porcentaje de desviación estándar relativa (DER) o coeficiente de variación (CV). La precisión debe evaluarse a tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La repetitividad es una medida del grado de dispersión de una serie de medidas realizadas en un espacio de tiempo corto (en un mismo día). La precisión intermedia es una medida de la dispersión de los resultados obtenidos por un método analítico en un espacio de tiempo más amplio que la repetitividad, modificando ciertas condiciones de operación: diferentes días, analistas, equipos, etc. Por último, la reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios, formando parte de los estudios interlaboratorio⁸⁹. En esta validación del método se realizó repetitividad preparando cinco réplicas de muestra, ver *Tabla 20*.

Tabla 20: Resultados de repetitividad con cinco réplicas de muestra.

Analito	\bar{X} (mg/L)	s	%CV	%CV _h
C _{6:0}	2,71	0,06	2,19	4,38
C _{8:0}	2,61	0,06	2,18	4,41
C _{10:0}	2,64	0,03	1,30	4,40
C _{12:0}	2,53	0,05	2,06	4,44
C _{14:1}	1,34	0,08	5,91	5,10
C _{16:1}	1,29	0,04	3,38	5,14
C _{18:1 n9(c+t)}	4	1	3	4
C _{18:2 n6(c+t)}	2,62	0,08	2,92	4,42
C _{18:3 (6n+3n)}	2,7	0,1	4,1	4,4

Para n=5

El Coeficiente de Variación (CV) es otra medida de la variabilidad, también conocida como la desviación estándar relativa (DER)⁷⁰, que viene definido por:

$$\%CV = \frac{100 * s}{\bar{x}} \quad (32)$$

donde s es la desviación estándar y \bar{x} la media. El %CV es menor al 10% para los analitos.

El Coeficiente de Variación de Horwitz (CV_h), está definido a través de la *ecuación (33)* obtenida de un estudio estadístico⁹⁴. En dicho estudio, Horwitz después de reunir una serie de datos (provenientes de 150 ensayos interlaboratorios organizados por la AOAC), observó que el coeficiente de variación de los valores medios dados por diferentes laboratorios aumentaban a medida que disminuía la concentración del analito^{94,95}, comportándose como se muestra en la *Figura 19*.

La ecuación de Horwitz está definida como:

$$\%CV_h = 2^{1-0,5\log C} \quad (33)$$

donde C es la concentración del analito (mg/L). El %CV_f también fue menor del 10% para todos los analitos

Por tanto, de la *Tabla 20*, se observan valores aceptables de precisión (Coeficiente de Variación de Horwitz) en función de la concentración para condiciones de repetitividad (aceptados por la AOAC), concluyendo que el método de análisis es preciso.

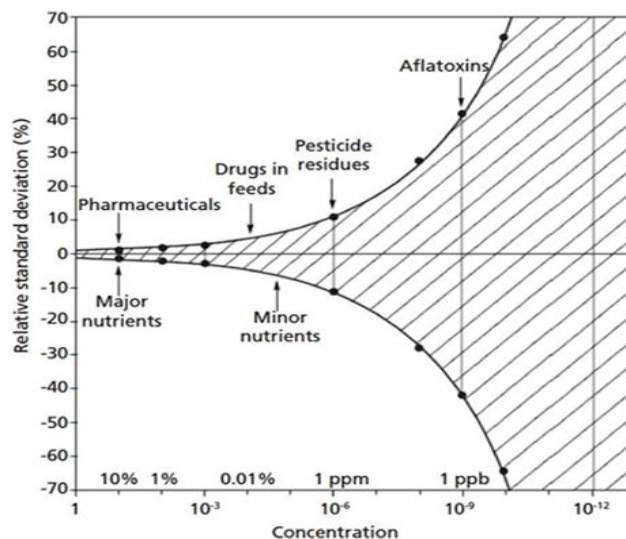


Figura 19: Trompeta de Horwitz, muestra la relación inversa entre la concentración del analito y la desviación estándar relativa. (Imagen tomada de: <http://www.chromatographyonline.com/know-your-sample-size-matters-0>).

4.1.1.6 Exactitud

Es el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor real del mensurando. Para la determinación de la exactitud del método analítico se utilizan porcentajes de recuperación, para esto se procede a dopar o enriquecer cuatro muestras a tres niveles de concentración diferentes con el mix FAMEs (rango bajo, medio y alto).

4.1.1.6.1 Porcentaje de recuperación

Es la cantidad que se recupera después de enriquecer la matriz con una cantidad conocida de analito. Para calcular el porcentaje de recuperación (%R) utilizamos la siguiente ecuación:

$$\%R = (C_{obtenida}/C_{teórica}) * 100\% \quad (34)$$

donde:

$C_{obtenida}$: Concentración del analito obtenida en muestra dopada o enriquecida.

$C_{teórica}$: Concentración del analito teórica en muestra dopada.

El procedimiento consistió en enriquecer la matriz en estudio mediante la adición de estándares de concentración definida (mix FAMES +IS), por triplicado y para tres niveles de concentración que se incluyeron dentro del rango de trabajo (rango bajo, medio y alto). Como criterio general para la aceptación de los resultados, los valores de recuperación deben estar entre el 70-120% y el coeficiente de variación debe ser igual o menor al 10%, ver *Tabla 21*.

Los límites aceptables de exactitud se dan estadísticamente con la prueba t de Student, con un límite de confianza del 95% y n-1 grados de libertad.

Como criterio de aceptación se tiene que $t_{exp} < t_{tab}$; $t_{tab} = 2,353$

Se calcula el t_{exp} con la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = [(100 - \%R)] / [(\sqrt{n}) * \%CV] \quad (35)$$

donde:

t_{exp} : t experimental

%R: Porcentaje de recuperación

n: Número de réplicas

%CV: Porcentaje del coeficiente de variación.

Tabla 21: Resultados de la validación del método. Exactitud (Porcentajes de recuperación).

Analito	Rango bajo			Rango medio			Rango alto		
	%R	%CV	t_{exp}	%R	%CV	t_{exp}	%R	%CV	t_{exp}
C _{6:0}	72,48	6,23	2,21	111,07	7,91	-0,70	117,30	11,74	-0,74
C _{8:0}	70,48	7,74	1,91	88,14	9,42	0,63	108,11	7,55	-0,54
C _{10:0}	132,60	3,24	-5,04	110,00	5,11	-0,98	78,06	12,27	0,89
C _{12:0}	84,25	3,92	2,01	94,99	7,21	0,35	71,40	9,08	1,58
C _{14:1}	81,84	6,99	1,30	87,48	9,49	0,66	96,08	8,56	0,23
C _{16:1}	79,72	5,17	1,96	72,71	11,56	1,18	86,73	7,85	0,85
C _{18:1 n9(c+t)}	114,02	9,51	-0,74	70,85	8,55	1,71	67,46	7,51	2,17
C _{18:2 n6(c+t)}	94,48	5,30	0,52	92,39	12,37	0,31	113,62	7,82	-0,87
C _{18:3 (6n+3n)}	73,80	7,29	1,80	91,18	7,34	0,60	70,64	10,43	1,41

Con base en los resultados presentados en la *Tabla 21*, se concluye que el método es exacto.

4.1.2 Cuantificación de ácidos grasos por GC-FID

La cuantificación en las muestras de mosto real (cepa *Carménère*) se realizó para nueve ácidos grasos por Cromatografía Gaseosa con detector FID: Cuatro ácidos grasos saturados de cadena media, MCFA ($C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$ y $C_{12:0}$), y cinco ácidos grasos de cadena larga insaturados, LCUFA ($C_{14:1}$, $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$), con dos curvas de calibración, una de rango bajo-medio y otra de rango medio-alto considerando el estándar interno $C_{9:0}$.

4.1.2.1 Fermentaciones normales

Ocho fermentaciones fueron realizadas a condiciones de operación normal, sin embargo, con los resultados obtenidos de la cuantificación por GC-FID, se encontró que el contenido de un analito a un mismo tiempo en una fermentación difería mucho cuando se comparaba el mismo analito al mismo tiempo con todas las fermentaciones, y así para el resto de los analitos. Estos datos anómalos se corroboraron mediante un test estadístico llamado test Q o Q de Dixon⁹⁰, a los se les aplicó la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{|valor\ sospechoso - valor\ más\ cercano|}{|valor\ más\ grande - valor\ más\ pequeño|} \quad (36)$$

Se utilizaron los valores críticos de Q para $P=0,05$. Como criterio se aplicó que, si el valor de Q calculado superó el valor crítico, se rechaza el valor sospechoso. Se rechazaron varios valores sospechosos, de los cuales podemos reconocer en la *Tabla 22* como VR (Valor Rechazado), y se eliminó por completo la fermentación ocho (F8).

Por lo tanto, en la siguiente tabla se registran todas las concentraciones de los ácidos grasos que fueron cuantificados por GC-FID en siete fermentaciones con condiciones normales de operación (28 °C, FAN 250 mg/L, concentración de azúcar inicial 227 g/L, saturación inicial de oxígeno, pH a 3,5).

Tabla 22: Resultados de la cuantificación por GC-FID en fermentaciones normales: Concentraciones (mg/L) de MCFA (C_{6:0}, C_{8:0}, C_{10:0} y C_{12:0}) y LCUFA (C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2} y C_{18:3}) en siete fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère*.

Ácidos grasos	Tiempo (h)	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	($\bar{X} \pm s$)*
C _{6:0}	0	2,383	2,383	2,380	2,383	6,094	6,095	6,096	4 ± 2
	24	1,791	6,609	7,817	6,609	19,857	15,901	8,222	10 ± 6
	48	13,225	45,477	36,876	45,477	VR	3,366	2,484	24 ± 20
	72	13,378	22,215	35,223	22,215	2,171	2,796	1,981	14 ± 13
	96	11,267	28,199	28,857	28,199	3,628	14,849	2,124	17 ± 12
	120	18,847	47,547	40,912	47,547	3,994	40,833	14,208	31 ± 18
C _{8:0}	0	0,543	0,544	0,546	0,547	3,365	3,369	3,366	2 ± 1
	24	2,069	6,135	8,405	13,329	49,858	17,160	37,196	19 ± 18
	48	34,191	35,689	31,958	22,147	VR	53,721	47,575	38 ± 11
	72	37,352	17,349	31,185	14,663	45,460	26,190	68,328	34 ± 18
	96	29,521	27,570	24,146	11,390	49,917	54,695	<LQM(0,325)	33 ± 16
	120	39,824	38,424	35,593	27,513	54,115	29,181	32,651	37 ± 9
C _{10:0}	0	4,835	4,834	4,832	4,831	1,833	1,830	1,833	4 ± 2
	24	5,608	4,806	6,707	10,562	26,986	6,954	19,980	12 ± 8
	48	VR	11,471	13,532	11,625	VR	20,845	17,317	15 ± 4
	72	VR	6,673	16,598	8,633	18,644	8,470	30,090	15 ± 9
	96	VR	11,147	14,713	6,554	20,294	19,260	<LQM(0,314)	14 ± 6
	120	VR	16,083	19,062	15,045	27,299	12,296	17,968	18 ± 5
C _{12:0}	0	1,740	1,744	1,745	1,744	1,122	1,124	1,122	1,5 ± 0,3
	24	3,356	1,735	1,567	2,606	4,960	2,328	0,962	2 ± 1
	48	VR	1,707	1,894	4,575	6,500	4,279	<LQM(0,456)	4 ± 2
	72	VR	1,275	1,500	1,679	4,305	2,145	4,871	3 ± 1
	96	VR	1,454	1,151	1,617	3,636	3,451	<LQM(0,300)	2 ± 1
	120	VR	2,108	1,526	1,267	8,748	2,705	5,906	4 ± 3
C _{14:1}	0	<LQM(0,221)	<LQM(0,221)	<LQM(0,221)	<LQM(0,221)	<LQM(0,240)	<LQM(0,240)	<LQM(0,240)	---
	24	<LQM(0,412)	<LQM(0,335)	<LQM(0,396)	1,060	0,824	<LQM(0,358)	0,822	0,9 ± 0,1
	48	2,171	<LQM(0,346)	<LQM(0,398)	1,940	<LQM(0,368)	<LQM(0,247)	<LQM(0,503)	2,0 ± 0,2
	72	0,967	<LQM(0,260)	<LQM(0,328)	<LQM(0,302)	<LQM(0,222)	<LQM(0,209)	0,540	0,8 ± 0,3
	96	<LQM(0,448)	<LQM(0,313)	<LQM(0,248)	<LQM(0,180)	<LQM(0,256)	<LQM(0,231)	1,833	---
	120	0,966	<LQM(0,451)	0,614	0,580	<LQM(0,257)	<LQM(0,348)	<LQM(0,245)	0,7 ± 0,2
C _{16:1}	0	2,648	2,649	2,646	2,640	<LQM(0,237)	<LQM(0,237)	<LQM(0,237)	2,646 ± 0,004
	24	8,585	30,607	<LQM(0,229)	VR	0,819	0,619	0,817	19 ± 29
	48	29,018	32,052	40,717	44,511	<LQM(0,364)	<LQM(0,243)	<LQM(0,327)	36 ± 7
	72	12,062	13,680	37,541	31,235	<LQM(0,219)	<LQM(0,390)	0,540	19 ± 15
	96	12,277	18,220	28,145	27,369	1,135	0,843	<LQM(0,284)	15 ± 12

	120	15,501	45,784	25,642	21,987	0,619	6,434	2,514	17 ± 16
C _{18:1}	0	12,523	12,524	12,526	12,526	<LQM(0,463)	<LQM(0,463)	<LQM(0,463)	12,525 ± 0,001
	24	4,240	16,956	20,097	18,201	6,321	17,230	8,250	13 ± 6
	48	7,971	22,841	19,574	7,327	6,013	4,147	2,019	10 ± 8
	72	4,389	9,676	17,616	5,052	4,511	1,643	2,968	6 ± 5
	96	6,71	12,294	14,763	14,157	2,436	2,065	4,271	8 ± 5
	120	8,776	26,955	16,091	14,495	9,376	3,341	8,87	12 ± 8
C _{18:2}	0	VR	VR	VR	VR	<LQM(0,323)	<LQM(0,323)	<LQM(0,323)	---
	24	34,489	<LQM(0,393)	<LQM(0,315)	14,070	0,932	<LQM(0,446)	2,276	13 ± 15
	48	47,811	<LQM(0,438)	3,192	13,146	<LQM(0,456)	<LQM(0,330)	<LQM(0,417)	21 ± 23
	72	40,469	1,827	<LQM(0,292)	14,634	<LQM(0,304)	0,536	<LQM(0,413)	14 ± 18
	96	55,979	<LQM(0,254)	3,385	15,070	<LQM(0,339)	<LQM(0,314)	1,655	19 ± 25
	120	62,168	3,718	<LQM(0,315)	13,146	<LQM(0,341)	<LQM(0,436)	3,104	20 ± 28
C _{18:3}	0	VR	VR	VR	VR	9,446	9,44	9,447	9,444 ± 0,004
	24	17,115	2,287	18,418	VR	2,595	6,059	2,773	8 ± 8
	48	22,303	2,295	9,368	13,778	0,762	2,331	1,456	7 ± 8
	72	VR	2,172	9,153	5,160	2,219	0,696	1,538	3 ± 3
	96	25,241	3,149	12,364	9,401	0,525	<LQM(0,473)	0,602	8 ± 9
	120	VR	9,594	11,069	10,485	4,039	2,096	1,438	6 ± 4

*(Media ± desviación estándar). Triplicado analítico.

VR= Valor rechazado.

LQM = Límite de cuantificación del método.

De la *Tabla 22*, se evidencian algunos casos donde la desviación estándar (s) es más grande que la media (\bar{X}), esto probablemente indica un sesgo en las mediciones, es decir, la presencia de valores extremos. Se espera que la desviación estándar generalmente sea la mitad o menos que el tamaño de la media, ya que ésta indica la dispersión del conjunto de datos de la población.

Las variaciones en los resultados del contenido de ácidos pudieron ser debido a:

-La amplia variabilidad en las concentraciones de una fermentación a otra puede deberse al hecho de trabajar con microorganismos (levadura *Saccharomyces cerevisiae*) porque su metabolismo puede variar por factores como la temperatura, oxigenación, nutrición, entre muchos otros que hacen que su respuesta sea muy diferente.

-Adicionalmente, errores en la derivatización pueden aportar a la incertidumbre de la medida durante el tratamiento de las muestras que quizás haya sido una etapa crucial. Posiblemente algunos de los ácidos grasos no se convirtieron en metil ésteres por una derivatización incompleta o por la formación de artefactos que pueden ser identificados como ácidos grasos, o una alteración de la composición de los ácidos grasos original durante la esterificación, como se menciona en el review de Shantha, N. C., and Guillermo E. Napolitano⁷⁹.

Al Makdessi *et al.*⁹⁶, concluyeron que el procedimiento de preparación de muestra afecta directamente los resultados cuantitativos. La fuente de problemas para la determinación de ácidos grasos por GC-FID surgen durante la preparación de muestra (extracción y derivatización), en la inyección, en la columna, en el detector y/o durante la recolección de datos.

-Errores asociados por la contaminación y subsecuente daño de la columna de GC como resultado de los rastros del reactivo de esterificación (si no se lava adecuadamente) o una muestra sucia.

La limpieza incompleta de la muestra puede provocar la acumulación de material refractario en la columna y el detector, lo que a su vez afecta la resolución y la cuantificación. Sin embargo, se descarta que esta sea el que haya aportado la mayor variabilidad ya que en la determinación de las cifras de mérito la derivatización funcionó satisfactoriamente.

-La mayor fuente probable que detectamos en todos los experimentos fue el hecho de haber congelado las muestras para su posterior cuantificación por GC-FID. La muestra no es la misma cuando recién se toma y cuando se descongela dos o tres meses después, es decir, sufre cambios químicos. En un estudio realizado por Spayd *et al.*⁹⁷ se evidenciaron los efectos de congelación en uvas, mosto y vino.

La acidez del vino disminuyó y el pH aumentó debido a la congelación. Esta caída en la acidez correspondió a un aumento en la concentración de potasio en el vino causada por una mayor precipitación del bitartrato de potasio que aumentó la

relación de malato/tartrato. La ruptura de las células debido a la congelación y al contacto prolongado con la piel durante la descongelación probablemente causó el aumento de la concentración de potasio. El pH del mosto depende de la concentración de potasio, la acidez total y las proporciones relativas de los principales ácidos orgánicos⁹⁷.

La congelación y descongelación da como resultado la ruptura celular, liberando la enzima polifenol oxidasa (PPO) que cataliza la formación de productos de adición de ésteres de hidroxycinamato (HCE) con compuestos que contienen tiol. Presumiblemente, la congelación y descongelación también daría lugar a la extracción de catequinas y proantocianidinas de las pieles. Estos a su vez podrían ser oxidados. Como dato adicional, existe poca literatura relaciona con los efectos de la congelación y la calidad del vino o mosto⁹⁷.

Por lo anteriormente mencionado, nos permiten concluir que la muestra ya no es la misma cuando sufre el efecto de congelación y descongelación, por tanto, se asocia la alta variabilidad en los resultados del contenido de ácidos grasos a este hecho. Lo cual hace que los modelos de calibración desarrollados con estos resultados hace poco viable el método para predecir concentraciones.

Una de las soluciones que se propone para disminuir esta variabilidad es no congelar las muestras y poder determinar las concentraciones de los analitos por GC-FID en el menor tiempo posible después de la toma de muestra.

Un aspecto importante a considerar es que la cuantificación de ácidos grasos $C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:1}$, $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$ por Cromatografía Gaseosa con detector FID durante la fermentación alcohólica del vino no había sido estudiada en la cepa *Carménère* hasta el momento.

4.1.2.2 Fermentaciones problemáticas

En la *Tabla 23*, se muestran las fermentaciones de la F9 hasta F27 con diferentes condiciones (descritas en el capítulo 3 de esta tesis) de fermentación a las normales, éstas también se cuantificaron en mg/L por GC-FID, de las cuales algunas se utilizaron para robustecer el modelo quimiométrico.

Tabla 23: Resultados de la cuantificación por GC-FID en fermentaciones problemáticas: Concentraciones (mg/L) de MCFA (C_{6:0}, C_{8:0}, C_{10:0} y C_{12:0}) y LCUFA (C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2} y C_{18:3}) en diecinueve fermentaciones problemáticas alcohólicas del vino *Carménère*.

Fermentaciones	Tiempo (horas)	Concentraciones (mg/L)								
		C6	C8	C10	C12	C14:1	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3
F9	0	<LQM(0,337)	<LQM(0,270)	<LQM(0,347)	<LQM(0,269)	ND	<LQM(0,159)	0,607	1,488	0,759
	24	0,794	1,616	1,017	<LQM(0,423)	ND	<LQM(0,294)	0,521	0,702	<LQM(0,382)
	48	0,659	1,468	0,952	<LQM(0,333)	ND	<LQM(0,146)	<LQM(0,454)	<LQM(0,347)	<LQM(0,300)
	72	0,650	1,179	0,800	<LQM(0,365)	ND	<LQM(0,18)	<LQM(0,465)	<LQM(0,464)	<LQM(0,347)
	96	0,678	1,211	0,726	<LQM(0,303)	ND	ND	<LQM(0,368)	<LQM(0,250)	<LQM(0,258)
	120	0,663	1,241	0,756	0,319	ND	<LQM(0,143)	<LQM(0,406)	<LQM(0,327)	<LQM(0,179)
	144	0,688	1,169	0,715	<LQM(0,324)	ND	<LQM(0,156)	<LQM(0,428)	<LQM(0,384)	<LQM(0,208)
	168	0,726	1,244	0,740	<LQM(0,321)	ND	<LQM(0,149)	<LQM(0,419)	<LQM(0,368)	<LQM(0,196)
	192	0,696	1,207	0,707	<LQM(0,317)	ND	<LQM(0,161)	<LQM(0,441)	<LQM(0,382)	<LQM(0,202)
	216	0,762	1,419	0,828	<LQM(0,336)	ND	<LQM(0,155)	<LQM(0,421)	<LQM(0,324)	<LQM(0,184)
	240	0,712	1,186	0,703	<LQM(0,314)	ND	ND	<LQM(0,426)	<LQM(0,359)	<LQM(0,194)
	276	0,688	1,180	0,698	<LQM(0,298)	ND	ND	<LQM(0,403)	<LQM(0,276)	<LQM(0,160)
	300	1,129	2,743	1,745	<LQM(0,532)	ND	<LQM(0,274)	0,724	0,840	<LQM(0,477)
	324	0,649	1,192	0,732	<LQM(0,338)	ND	<LQM(0,174)	<LQM(0,475)	<LQM(0,435)	<LQM(0,291)
F10	0	1,709	1,093	0,808	0,805	<LQM(0,281)	1,068	2,784	13,587	5,502
	24	0,694	1,238	0,880	<LQM(0,349)	ND	<LQM(0,17)	<LQM(0,408)	<LQM(0,408)	<LQM(0,226)
	48	<LQM(0,520)	1,262	0,722	<LQM(0,294)	ND	<LQM(0,144)	<LQM(0,367)	<LQM(0,226)	<LQM(0,294)
	72	<LQM(0,523)	1,371	0,908	<LQM(0,348)	ND	ND	<LQM(0,424)	<LQM(0,279)	<LQM(0,287)
	96	<LQM(0,336)	0,608	0,859	<LQM(0,595)	ND	<LQM(0,344)	0,530	0,853	<LQM(0,382)
	120	0,765	1,326	0,718	<LQM(0,295)	ND	<LQM(0,172)	<LQM(0,400)	<LQM(0,440)	<LQM(0,327)
	168	1,896	4,896	2,368	0,715	0,582	0,578	0,815	0,679	1,214
	192	2,145	5,703	3,429	0,889	ND	<LQM(0,257)	0,712	0,707	<LQM(0,448)
	216	0,687	1,179	0,702	<LQM(0,302)	ND	ND	<LQM(0,413)	<LQM(0,294)	<LQM(0,163)
	240	0,820	1,590	1,421	<LQM(0,423)	ND	<LQM(0,193)	<LQM(0,480)	0,543	<LQM(0,294)
	276	<LQM(0,594)	1,354	0,799	<LQM(0,336)	ND	ND	<LQM(0,387)	<LQM(0,290)	<LQM(0,275)

	300	0,638	1,026	0,695	<LQM(0,297)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,395)	<LQM(0,279)	<LQM(0,162)
F11	0	1,709	1,093	1,935	0,805	<LQM(0,281)	1,068	2,784	13,587	5,502
	24	0,726	3,650	2,316	1,023	<LQM(0,349)	2,371	0,904	<LQM(0,437)	1,891
	48	15,570	36,647	15,738	2,248	<LQM(0,341)	0,508	1,693	1,934	0,980
	72	6,870	29,476	20,434	3,735	<LQM(0,375)	0,737	2,024	4,105	1,782
	96	<LQM(0,573)	1,394	0,858	<LQM(0,359)	ND	<LQM(0,144)	<LQM(0,429)	<LQM(0,283)	<LQM(0,294)
	120	0,694	1,072	8,355	0,971	<LQM(0,334)	0,569	0,560	<LQM(0,421)	0,690
	144	1,068	2,830	1,597	<LQM(0,487)	ND	<LQM(0,185)	<LQM(0,465)	<LQM(0,462)	<LQM(0,337)
	168	3,231	8,369	3,699	1,179	ND	0,774	1,061	1,882	0,889
	192	16,390	37,032	15,784	3,584	<LQM(0,325)	0,653	4,104	3,051	1,060
	216	0,964	1,974	1,088	0,868	<LQM(0,217)	<LQM(0,345)	0,552	0,758	0,545
	240	0,819	1,589	1,421	<LQM(0,424)	ND	<LQM(0,212)	<LQM(0,481)	0,544	<LQM(0,302)
	276	1,077	2,624	<LQM(0,357)	<LQM(0,339)	<LQM(0,217)	<LQM(0,214)	<LQM(0,439)	<LQM(0,427)	<LQM(0,442)
	300	1,801	3,821	2,452	1,005	0,863	2,356	3,194	0,972	1,808
	324	4,297	12,880	7,475	2,323	<LQM(0,201)	1,858	2,265	4,411	1,783
F12	0	2,042	0,565	0,523	<LQM(0,489)	0,636	11,814	0,589	1,840	10,514
	24	5,657	10,058	5,041	5,054	0,921	11,675	13,345	43,697	16,652
	48	2,958	7,177	1,728	1,575	1,416	3,519	1,674	1,549	2,977
	72	15,217	59,833	20,286	4,420	0,773	1,417	4,244	3,874	1,617
	96	2,689	4,472	1,402	<LQM(0,472)	ND	ND	<LQM(0,450)	<LQM(0,284)	<LQM(0,278)
	120	5,851	12,077	4,768	1,003	ND	<LQM(0,210)	1,723	0,577	<LQM(0,330)
	144	1,249	2,717	1,281	<LQM(0,414)	ND	<LQM(0,178)	<LQM(0,465)	<LQM(0,321)	<LQM(0,303)
	168	0,784	1,258	0,536	<LQM(0,348)	ND	ND	<LQM(0,367)	<LQM(0,151)	<LQM(0,255)
	192	7,735	87,588	84,730	8,138	1,557	6,803	14,287	7,164	3,274
F13	0	ND	ND	<LQM(0,326)	<LQM(0,309)	ND	ND	0,224	<LQM(0,264)	3,374
	24	0,946	2,515	3,527	3,354	2,712	<LQM(0,193)	2,076	0,603	5,368
	48	1,011	3,513	4,275	4,066	2,849	ND	0,876	<LQM(0,258)	2,309
	72	0,936	3,827	4,801	4,565	3,340	<LQM(0,227)	1,487	0,803	5,201
	96	1,062	4,149	5,730	5,449	4,311	ND	1,309	0,891	5,868
	120	1,412	5,575	9,121	8,675	7,483	ND	2,258	1,151	7,865
	144	0,802	3,574	7,871	7,487	9,159	1,653	5,355	3,614	15,928
	168	1,115	3,861	6,576	6,254	6,577	ND	3,852	2,127	8,756
	192	0,934	3,226	6,996	6,654	8,479	<LQM(0,234)	5,367	4,424	16,236
	216	1,119	3,841	8,177	7,778	9,911	<LQM(0,195)	5,879	4,840	17,443
	240	0,952	3,163	6,819	6,486	8,037	<LQM(0,174)	4,634	4,010	14,752
F14	0	ND	ND	0,940	0,893	0,698	ND	1,024	3,330	22,908
	24	<LQM(0,557)	1,812	3,535	3,362	4,066	<LQM(0,223)	5,510	3,244	16,261
	48	<LQM(0,401)	1,762	2,747	2,612	3,034	ND	3,375	1,999	10,958
	72	<LQM(0,359)	1,369	2,356	2,240	2,739	ND	3,080	2,231	10,627
	96	<LQM(0,201)	0,942	3,776	3,590	2,348	ND	3,545	2,171	7,853
	120	<LQM(0,288)	1,236	2,432	2,312	2,742	ND	2,387	2,102	9,516
	144	<LQM(0,287)	1,229	3,193	3,037	3,657	ND	3,942	2,781	12,131

	168	<LQM(0,356)	1,306	2,577	2,451	2,731	ND	2,532	1,956	9,440
	192	<LQM(0,374)	1,138	2,697	2,565	3,646	ND	3,202	2,952	11,344
	216	<LQM(0,184)	0,698	2,216	2,107	3,124	ND	2,936	2,547	10,336
	240	<LQM(0,362)	1,218	1,943	1,847	2,475	ND	2,212	1,880	8,021
F15	0	<LQM(0,279)	<LQM(0,261)	ND	<LQM(0,275)	ND	ND	<LQM(0,498)	1,005	<LQM(0,426)
	24	2,302	3,771	2,098	1,929	<LQM(0,331)	4,108	4,798	15,186	5,838
	48	0,725	1,372	1,145	<LQM(0,534)	<LQM(0,134)	<LQM(0,348)	0,576	1,066	0,569
	72	<LQM(0,466)	0,748	0,553	<LQM(0,364)	ND	<LQM(0,173)	0,509	0,499	<LQM(0,241)
	96	<LQM(0,498)	0,706	<LQM(0,471)	<LQM(0,294)	ND	ND	<LQM(0,378)	<LQM(0,362)	<LQM(0,195)
	120	<LQM(0,570)	1,300	0,741	<LQM(0,347)	ND	<LQM(0,179)	<LQM(0,425)	0,492	<LQM(0,339)
	144	<LQM(0,511)	0,896	0,512	<LQM(0,292)	ND	<LQM(0,151)	<LQM(0,406)	<LQM(0,356)	<LQM(0,192)
	168	<LQM(0,518)	0,913	0,485	<LQM(0,276)	ND	ND	<LQM(0,366)	<LQM(0,268)	<LQM(0,157)
	192	<LQM(0,537)	0,889	0,501	<LQM(0,278)	ND	ND	<LQM(0,374)	<LQM(0,292)	<LQM(0,164)
	216	<LQM(0,543)	0,994	0,516	<LQM(0,281)	ND	ND	<LQM(0,379)	<LQM(0,317)	<LQM(0,173)
	240	<LQM(0,511)	0,955	0,518	<LQM(0,273)	ND	<LQM(0,188)	<LQM(0,368)	<LQM(0,261)	<LQM(0,154)
	264	<LQM(0,527)	1,030	0,571	<LQM(0,278)	ND	ND	<LQM(0,367)	<LQM(0,269)	<LQM(0,157)
	288	<LQM(0,558)	0,995	0,543	<LQM(0,272)	ND	ND	<LQM(0,370)	<LQM(0,267)	<LQM(0,155)
	312	<LQM(0,569)	1,036	0,610	<LQM(0,283)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,383)	<LQM(0,301)	<LQM(0,174)
	336	<LQM(0,570)	1,120	0,621	<LQM(0,281)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,385)	<LQM(0,310)	<LQM(0,173)
	360	<LQM(0,560)	0,997	0,561	<LQM(0,271)	ND	ND	<LQM(0,224)	<LQM(0,256)	ND
384	<LQM(0,537)	0,967	0,570	<LQM(0,279)	ND	<LQM(0,154)	<LQM(0,384)	<LQM(0,318)	<LQM(0,171)	
F16	0	<LQM(0,295)	ND	<LQM(0,269)	<LQM(0,256)	ND	<LQM(0,144)	0,598	1,873	0,898
	24	0,640	1,558	1,556	<LQM(0,580)	ND	0,555	0,660	1,401	0,709
	48	<LQM(0,448)	0,944	0,716	<LQM(0,217)	ND	ND	<LQM(0,242)	<LQM(0,297)	<LQM(0,164)
	72	0,635	1,313	0,701	<LQM(0,304)	ND	ND	<LQM(0,368)	<LQM(0,284)	<LQM(0,162)
	96	<LQM(0,602)	1,478	0,766	<LQM(0,314)	ND	ND	<LQM(0,377)	<LQM(0,267)	<LQM(0,159)
	120	0,644	1,512	0,797	<LQM(0,314)	ND	<LQM(0,144)	<LQM(0,395)	<LQM(0,278)	<LQM(0,161)
	144	<LQM(0,564)	1,195	0,699	<LQM(0,349)	ND	<LQM(0,179)	<LQM(0,400)	<LQM(0,419)	<LQM(0,210)
	168	0,610	1,414	0,770	<LQM(0,335)	ND	<LQM(0,18)	<LQM(0,389)	<LQM(0,346)	<LQM(0,186)
	192	<LQM(0,489)	1,423	0,805	<LQM(0,304)	ND	<LQM(0,205)	<LQM(0,399)	<LQM(0,267)	<LQM(0,263)
	216	0,718	1,518	0,852	<LQM(0,322)	ND	<LQM(0,146)	<LQM(0,412)	<LQM(0,331)	<LQM(0,173)
	240	1,773	4,901	2,543	0,632	ND	<LQM(0,284)	0,645	0,840	<LQM(0,407)
264	1,009	2,931	1,700	<LQM(0,479)	ND	<LQM(0,222)	0,512	0,542	<LQM(0,347)	
F17	0	<LQM(0,282)	ND	ND	ND	ND	ND	0,501	1,359	0,611
	24	<LQM(0,496)	0,957	0,543	<LQM(0,300)	ND	<LQM(0,253)	0,445	0,617	<LQM(0,393)
	48	0,789	1,479	0,606	<LQM(0,302)	ND	ND	<LQM(0,374)	<LQM(0,325)	<LQM(0,182)
	72	0,721	1,418	0,823	<LQM(0,299)	ND	ND	<LQM(0,392)	<LQM(0,272)	<LQM(0,160)
	96	0,719	1,567	0,948	<LQM(0,338)	ND	<LQM(0,258)	<LQM(0,408)	<LQM(0,354)	<LQM(0,196)
	120	0,752	1,781	1,035	<LQM(0,373)	ND	<LQM(0,377)	0,511	0,605	<LQM(0,280)
	144	0,664	1,367	0,798	<LQM(0,326)	ND	<LQM(0,259)	<LQM(0,425)	<LQM(0,380)	<LQM(0,195)
	168	0,779	2,295	0,917	<LQM(0,324)	ND	<LQM(0,256)	<LQM(0,440)	<LQM(0,372)	<LQM(0,188)
F18	0	<LQM(0,531)	0,927	<LQM(0,275)	<LQM(0,507)	ND	1,180	0,915	2,842	1,356
	24	<LQM(0,308)	<LQM(0,260)	<LQM(0,282)	<LQM(0,262)	ND	<LQM(0,188)	0,676	2,819	1,303

	48	0,687	6,769	0,664	<LQM(0,374)	ND	<LQM(0,201)	<LQM(0,391)	0,430	<LQM(0,230)
	72	0,729	1,327	0,620	<LQM(0,316)	ND	0,678	<LQM(0,448)	<LQM(0,291)	<LQM(0,169)
	120	0,679	1,698	0,869	<LQM(0,356)	ND	<LQM(0,228)	<LQM(0,397)	<LQM(0,320)	<LQM(0,183)
	144	0,760	1,900	0,891	<LQM(0,355)	ND	<LQM(0,228)	<LQM(0,409)	<LQM(0,322)	<LQM(0,182)
	168	0,769	2,172	1,275	0,630	ND	<LQM(0,325)	<LQM(0,383)	<LQM(0,304)	<LQM(0,178)
	192	0,768	1,850	1,114	<LQM(0,549)	ND	<LQM(0,297)	<LQM(0,387)	<LQM(0,279)	<LQM(0,166)
	216	0,791	1,884	0,969	<LQM(0,508)	ND	<LQM(0,372)	<LQM(0,433)	<LQM(0,402)	<LQM(0,213)
	240	1,001	2,779	1,425	<LQM(0,521)	ND	<LQM(0,457)	0,526	0,509	<LQM(0,348)
	264	0,874	2,017	0,965	<LQM(0,386)	ND	<LQM(0,205)	<LQM(0,435)	<LQM(0,401)	<LQM(0,19)
F19	0	<LQM(0,289)	<LQM(0,275)	<LQM(0,270)	<LQM(0,260)	<LQM(0,265)	ND	<LQM(0,226)	0,588	3,041
	24	0,870	1,109	0,857	<LQM(0,441)	ND	0,513	0,569	0,932	0,517
	48	1,532	83,093	0,971	<LQM(0,455)	ND	<LQM(0,328)	0,587	0,859	<LQM(0,498)
	72	<LQM(0,312)	1,774	0,911	<LQM(0,418)	ND	<LQM(0,263)	0,601	<LQM(0,355)	0,641
	96	<LQM(0,379)	0,593	0,503	<LQM(0,414)	ND	<LQM(0,268)	<LQM(0,482)	0,769	<LQM(0,350)
	120	<LQM(0,496)	0,965	0,951	0,979	ND	0,851	1,117	3,530	1,547
	144	0,918	1,751	0,877	<LQM(0,410)	ND	<LQM(0,245)	0,613	0,823	0,463
	168	0,854	1,708	0,819	<LQM(0,361)	ND	<LQM(0,174)	1,339	0,540	<LQM(0,362)
	192	1,047	1,897	0,747	<LQM(0,320)	ND	<LQM(0,162)	<LQM(0,471)	<LQM(0,408)	<LQM(0,306)
	216	1,092	2,129	0,842	<LQM(0,326)	ND	<LQM(0,165)	<LQM(0,450)	<LQM(0,396)	<LQM(0,299)
	240	1,179	2,023	0,824	<LQM(0,308)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,384)	<LQM(0,303)	<LQM(0,271)
	264	0,838	1,590	0,689	<LQM(0,303)	ND	<LQM(0,167)	<LQM(0,411)	<LQM(0,346)	<LQM(0,184)
	288	<LQM(0,542)	1,015	0,552	<LQM(0,331)	ND	<LQM(0,241)	0,505	0,556	<LQM(0,271)
312	1,022	2,012	0,814	<LQM(0,312)	ND	<LQM(0,178)	0,624	<LQM(0,429)	<LQM(0,267)	
336	1,095	2,000	0,838	<LQM(0,310)	ND	<LQM(0,184)	<LQM(0,435)	<LQM(0,388)	<LQM(0,297)	
F20	0	<LQM(0,289)	<LQM(0,275)	<LQM(0,270)	<LQM(0,260)	<LQM(0,265)	ND	<LQM(0,226)	0,588	<LQM(3,041)
	24	0,969	1,272	0,865	<LQM(0,424)	ND	<LQM(0,415)	0,532	0,795	<LQM(0,466)
	48	0,991	1,663	0,863	<LQM(0,411)	ND	<LQM(0,346)	0,529	0,829	<LQM(0,458)
	72	0,604	0,970	0,547	<LQM(0,361)	ND	<LQM(0,280)	0,530	0,751	<LQM(0,430)
	96	1,101	1,759	0,794	<LQM(0,375)	ND	<LQM(0,243)	0,520	0,670	<LQM(0,405)
	120	0,932	1,671	0,734	<LQM(0,343)	ND	<LQM(0,208)	<LQM(0,427)	0,574	<LQM(0,364)
	144	<LQM(0,523)	0,852	<LQM(0,476)	<LQM(0,283)	ND	<LQM(0,150)	<LQM(0,488)	0,543	<LQM(0,208)
	168	<LQM(0,535)	0,903	0,498	<LQM(0,274)	ND	<LQM(0,132)	<LQM(0,382)	<LQM(0,303)	<LQM(0,164)
	192	<LQM(0,506)	0,810	0,390	<LQM(0,250)	ND	ND	<LQM(0,372)	<LQM(0,228)	ND
	216	<LQM(0,538)	0,867	<LQM(0,468)	<LQM(0,270)	ND	<LQM(0,139)	<LQM(0,382)	<LQM(0,304)	<LQM(0,165)
	240	<LQM(0,488)	0,955	<LQM(0,444)	<LQM(0,268)	ND	<LQM(0,198)	<LQM(0,461)	<LQM(0,368)	<LQM(0,171)
	264	<LQM(0,510)	1,363	<LQM(0,450)	<LQM(0,265)	ND	<LQM(0,142)	<LQM(0,466)	0,504	<LQM(0,186)
	288	0,674	1,044	0,510	<LQM(0,281)	ND	ND	<LQM(0,378)	<LQM(0,256)	<LQM(0,162)
	312	0,629	0,941	<LQM(0,473)	<LQM(0,264)	ND	<LQM(0,124)	<LQM(0,223)	<LQM(0,223)	ND
336	<LQM(0,584)	1,065	0,540	<LQM(0,280)	ND	ND	<LQM(0,376)	<LQM(0,252)	<LQM(0,177)	
F21	0	<LQM(0,289)	<LQM(0,275)	<LQM(0,270)	<LQM(0,260)	<LQM(0,265)	ND	<LQM(0,226)	0,588	3,041
	24	<LQM(0,544)	0,920	0,961	<LQM(0,596)	ND	1,111	0,705	1,780	0,885
	48	<LQM(0,557)	0,673	<LQM(0,429)	<LQM(0,304)	ND	<LQM(0,173)	<LQM(0,399)	<LQM(0,387)	<LQM(0,216)
	72	0,623	0,794	<LQM(0,460)	<LQM(0,307)	ND	<LQM(0,162)	<LQM(0,404)	<LQM(0,368)	<LQM(0,196)

	96	<LQM(0,551)	0,734	<LQM(0,443)	<LQM(0,280)	ND	ND	<LQM(0,363)	<LQM(0,299)	<LQM(0,166)
	120	<LQM(0,546)	0,848	<LQM(0,476)	<LQM(0,294)	ND	ND	<LQM(0,406)	<LQM(0,308)	<LQM(0,167)
	144	<LQM(0,594)	0,807	<LQM(0,467)	<LQM(0,273)	ND	ND	ND	ND	ND
	168	<LQM(0,486)	0,783	<LQM(0,459)	<LQM(0,267)	ND	ND	ND	ND	ND
	192	<LQM(0,520)	0,893	0,502	<LQM(0,272)	ND	ND	ND	<LQM(0,225)	ND
	216	<LQM(0,576)	1,432	0,549	<LQM(0,297)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,376)	<LQM(0,334)	<LQM(0,185)
	240	<LQM(0,563)	0,938	0,496	<LQM(0,273)	ND	ND	ND	<LQM(0,235)	ND
	264	<LQM(0,595)	1,139	0,528	<LQM(0,287)	ND	ND	<LQM(0,423)	<LQM(0,236)	ND
	288	<LQM(0,522)	0,960	0,517	<LQM(0,278)	ND	ND	<LQM(0,378)	<LQM(0,268)	ND
	312	<LQM(0,525)	0,904	0,488	<LQM(0,284)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,365)	ND	<LQM(0,160)
	336	0,608	1,130	0,587	<LQM(0,295)	ND	<LQM(0,145)	<LQM(0,386)	<LQM(0,316)	<LQM(0,172)
F22	0	<LQM(0,289)	<LQM(0,275)	<LQM(0,270)	<LQM(0,260)	<LQM(0,265)	ND	<LQM(0,226)	0,588	3,041
	24	<LQM(0,446)	<LQM(0,569)	<LQM(0,407)	<LQM(0,269)	ND	<LQM(0,189)	<LQM(0,396)	<LQM(0,387)	<LQM(0,199)
	48	<LQM(0,454)	0,644	<LQM(0,394)	<LQM(0,265)	ND	<LQM(0,143)	<LQM(0,381)	<LQM(0,331)	<LQM(0,178)
	72	<LQM(0,539)	<LQM(0,559)	<LQM(0,489)	<LQM(0,266)	ND	<LQM(0,149)	<LQM(0,407)	<LQM(0,365)	<LQM(0,189)
	96	<LQM(0,470)	0,733	<LQM(0,366)	<LQM(0,254)	ND	ND	<LQM(0,424)	<LQM(0,295)	<LQM(0,163)
	120	<LQM(0,477)	0,895	<LQM(0,415)	<LQM(0,255)	ND	ND	<LQM(0,380)	<LQM(0,258)	<LQM(0,160)
	144	<LQM(0,462)	0,661	<LQM(0,341)	<LQM(0,054)	ND	ND	ND	<LQM(0,228)	<LQM(0,139)
	168	<LQM(0,463)	0,737	<LQM(0,392)	<LQM(0,261)	ND	ND	<LQM(0,396)	<LQM(0,380)	<LQM(0,198)
	192	<LQM(0,552)	0,971	<LQM(0,430)	<LQM(0,264)	ND	ND	<LQM(0,381)	<LQM(0,322)	<LQM(0,197)
	216	<LQM(0,523)	0,740	<LQM(0,396)	<LQM(0,271)	ND	<LQM(0,146)	<LQM(0,397)	<LQM(0,489)	<LQM(0,208)
	240	<LQM(0,494)	0,658	<LQM(0,374)	<LQM(0,256)	ND	ND	<LQM(0,383)	<LQM(0,365)	<LQM(0,196)
	264	<LQM(0,482)	0,669	<LQM(0,385)	<LQM(0,258)	ND	ND	<LQM(0,375)	<LQM(0,311)	<LQM(0,168)
	288	<LQM(0,448)	0,667	<LQM(0,393)	<LQM(0,261)	ND	ND	<LQM(0,398)	<LQM(0,368)	<LQM(0,193)
	312	<LQM(0,444)	0,649	<LQM(0,382)	<LQM(0,258)	ND	ND	ND	<LQM(0,340)	<LQM(0,181)
336	<LQM(0,526)	0,839	<LQM(0,412)	<LQM(0,261)	ND	<LQM(0,152)	0,609	<LQM(0,476)	<LQM(0,195)	
F23	0	<LQM(0,282)	ND	ND	<LQM(0,039)	ND	ND	<LQM(0,394)	0,616	<LQM(0,295)
	24	<LQM(0,557)	0,944	0,516	<LQM(0,287)	ND	<LQM(0,155)	<LQM(0,412)	<LQM(0,334)	<LQM(0,170)
	48	<LQM(0,522)	1,118	0,575	<LQM(0,289)	ND	<LQM(0,143)	<LQM(0,367)	<LQM(0,277)	<LQM(0,159)
	72	<LQM(0,508)	1,054	0,561	<LQM(0,286)	ND	<LQM(0,163)	<LQM(0,485)	<LQM(0,359)	<LQM(0,172)
	96	0,609	1,174	0,644	<LQM(0,301)	ND	<LQM(0,153)	<LQM(0,389)	<LQM(0,306)	<LQM(0,166)
	120	0,628	1,147	0,654	<LQM(0,295)	ND	ND	<LQM(0,372)	<LQM(0,274)	<LQM(0,158)
	144	0,609	1,174	0,644	<LQM(0,301)	ND	<LQM(0,153)	<LQM(0,389)	<LQM(0,306)	<LQM(0,166)
F24	0	<LQM(0,284)	ND	ND	ND	ND	ND	<LQM(0,428)	0,860	<LQM(0,390)
	24	<LQM(0,589)	1,100	0,640	<LQM(0,333)	ND	<LQM(0,188)	<LQM(0,391)	<LQM(0,399)	<LQM(0,206)
	48	0,664	1,403	0,642	<LQM(0,306)	ND	ND	0,969	<LQM(0,285)	<LQM(0,163)
	72	0,826	1,545	0,667	<LQM(0,298)	ND	ND	ND	<LQM(0,271)	ND
	96	1,322	1,720	0,744	<LQM(0,303)	ND	ND	<LQM(0,392)	<LQM(0,253)	<LQM(0,149)
	120	1,105	1,958	0,867	<LQM(0,336)	ND	<LQM(0,170)	<LQM(0,399)	<LQM(0,323)	<LQM(0,172)
	144	1,265	2,037	0,876	<LQM(0,328)	ND	<LQM(0,154)	<LQM(0,381)	<LQM(0,306)	<LQM(0,166)
F25	0	<LQM(0,269)	ND	<LQM(0,261)	ND	ND	ND	<LQM(0,419)	0,757	<LQM(0,352)
	24	0,610	1,038	0,669	<LQM(0,297)	ND	<LQM(0,157)	<LQM(0,419)	<LQM(0,437)	<LQM(0,166)

	48	<LQM(0,294)	1,473	1,006	<LQM(0,340)	ND	<LQM(0,157)	<LQM(0,385)	<LQM(0,315)	<LQM(0,274)
	72	<LQM(0,534)	1,491	0,922	<LQM(0,307)	ND	ND	<LQM(0,365)	<LQM(0,268)	ND
	96	<LQM(0,559)	1,498	0,861	<LQM(0,313)	ND	ND	<LQM(0,371)	<LQM(0,270)	<LQM(0,157)
	120	<LQM(0,586)	1,331	0,715	<LQM(0,291)	ND	<LQM(0,150)	<LQM(0,368)	<LQM(0,258)	<LQM(0,149)
	144	ND	1,346	0,677	<LQM(0,284)	ND	<LQM(0,160)	<LQM(0,384)	<LQM(0,243)	<LQM(0,388)
F26	0	<LQM(0,268)	ND	ND	ND	ND	<LQM(0,137)	<LQM(0,417)	0,764	<LQM(0,339)
	24	0,682	1,721	1,012	<LQM(0,348)	ND	<LQM(0,143)	<LQM(0,365)	<LQM(0,290)	<LQM(0,164)
	48	1,695	1,155	6,832	0,953	0,812	0,808	2,219	0,920	1,701
	72	0,620	1,641	0,992	<LQM(0,328)	ND	ND	ND	<LQM(0,251)	<LQM(0,144)
	96	<LQM(0,327)	<LQM(0,298)	<LQM(0,290)	<LQM(0,302)	ND	<LQM(0,155)	<LQM(0,379)	<LQM(0,321)	<LQM(0,318)
	120	0,629	1,528	0,869	<LQM(0,302)	ND	ND	ND	<LQM(0,23)	ND
	144	0,661	1,692	1,165	<LQM(0,379)	ND	<LQM(0,164)	<LQM(0,398)	<LQM(0,396)	<LQM(0,205)
F27	0	<LQM(0,335)	<LQM(0,303)	<LQM(0,295)	<LQM(0,283)	<LQM(0,176)	<LQM(0,159)	<LQM(0,383)	0,647	<LQM(0,400)
	24	0,788	2,990	2,124	0,615	ND	<LQM(0,325)	0,538	0,848	0,514
	48	<LQM(0,423)	<LQM(0,359)	<LQM(0,343)	<LQM(0,502)	<LQM(0,204)	<LQM(0,201)	<LQM(0,426)	<LQM(0,285)	<LQM(0,415)
	72	0,844	<LQM(0,303)	<LQM(0,295)	<LQM(0,391)	ND	<LQM(0,159)	<LQM(0,383)	<LQM(0,242)	<LQM(0,327)
	96	0,914	3,288	2,377	<LQM(0,531)	ND	<LQM(0,193)	<LQM(0,460)	0,499	<LQM(0,349)
	120	<LQM(0,399)	1,232	0,854	ND	ND	ND	ND	0,033	<LQM(0,291)
	144	0,801	1,795	0,773	<LQM(0,294)	ND	ND	<LQM(0,378)	<LQM(0,221)	1,367

Triplicado analítico.

ND = No detectado

LQM = Límite de cuantificación del método

El contenido de ácidos grasos fue estudiado en veintisiete fermentaciones alcohólicas de la cepa *Carmènère* usando tres temperaturas diferentes 24, 28 y 32 °C; y tres estrategias de aireación:

- i. Aireación inicial
- ii. Sin aireación (anaeróbica)
- iii. Aireación inicial y al final de la fase exponencial.

El promedio de los perfiles de densidad para las siete fermentaciones (F1-F7) a 28 °C, aireación inicial y pH de 3,5 se muestra en la *Figura 20(A)*. Los azúcares residuales estuvieron por debajo de 0,80 g/L cuando alcanzaron las 120 h aproximadamente. Sin embargo, el promedio de las fermentaciones desarrolladas a 24 °C y 32 °C demostró un comportamiento diferente.

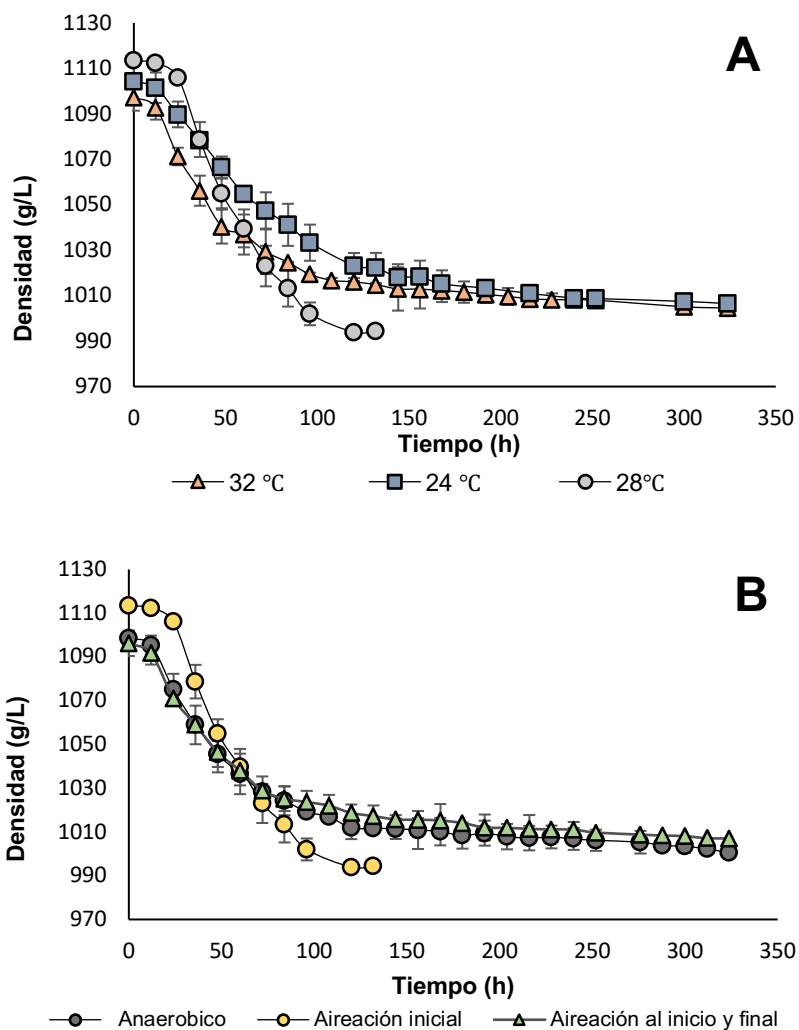


Figura 20: (A) Promedio del perfil de densidad a diferentes temperaturas 24, 28 y 32 °C. (B) Promedio del perfil de densidad con diferentes estrategias de aireación: Aireación inicial, anaeróbica y, aireación al inicio y final de la fase exponencial.

Como se puede ver en la *Figura 20(A)*, el perfil a 32 °C claramente fue de fermentaciones atascadas y ralentizadas más conocidas en inglés como “stuck and sluggish”; ellas tuvieron un consumo de azúcar incompleto (21,30 g/L), y el proceso de fermentación se extendió por más de 300 h. Además, las fermentaciones a 24 °C presentaron un comportamiento lento por más de diez días (250 h), el proceso terminó con 0,56 g/L de azúcar residual.

Análogamente, se observaron diferentes perfiles de densidades cuando se aplicaron diferentes estrategias de aireación, ver *Figura 20(B)*. Se observó un comportamiento normal en las fermentaciones con aireación inicial a diferencia de las anaeróbicas (sin aireación), y con dos etapas de aireación (inicio y final).

El comportamiento de las veintisiete fermentaciones observadas a través de los perfiles de densidad fue confirmado por la cinética de la biomasa, como se muestra en la *Figura 21(A)* y la *Figura 21(B)*. La *Figura 21(A)* muestra el efecto de la temperatura y la *Figura 3(B)* muestra el efecto del oxígeno en el crecimiento de la biomasa. Notoriamente, las temperaturas de 24, 28 y 32 °C afectaron el crecimiento de las levaduras. A 24 °C, la población de levadura sigue siendo mayor que a 32 °C, pero más pequeña que a 28 °C. A 32 °C la cinética de biomasa se prolongó hasta las 300 h.

En la *Figura 21(B)* se muestra que las fermentaciones bajo condiciones anaeróbicas y bajo condiciones de aireación al inicio y al final de la fase exponencial no fueron muy diferentes en términos de población de levadura. En general, en ambos casos, el crecimiento de la levadura fue afectado por la temperatura y el oxígeno.

Fueron determinados nueve ácidos grasos: cuatro MCFA ($C_{6:0}$, $C_{8:0}$, $C_{10:0}$ y $C_{12:0}$) y cinco LCUFA ($C_{14:1}$, $C_{16:1}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ y $C_{18:3}$), de los cuales pudieron cuantificarse en miligramos por litro en las veintisiete fermentaciones y se agruparon por efectos de temperatura y oxígeno, como se muestra en las *Tabla 14* y *22*. Para 28 °C y aireación inicial de la F1 hasta la F7, para 24 °C la F13 y F21, para 32 °C la F9, F22 y F23. Para la condición anaeróbica la F11, F16, F19 y F24, y con aireación al inicio y final de la fase exponencial la F14, F20 y F25.

La síntesis de los MCFA comenzó desde el inicio de la fermentación, alcanzando los niveles más altos de concentración alrededor de 1000 g/L de densidad que coincide con el final de la fermentación (120 h), como se muestra en la *Figura 20(A)*. Hubo un aumento en la producción de estos ácidos grasos poco después del inicio de la fermentación, lo que corresponde con el aumento de la población de levadura.

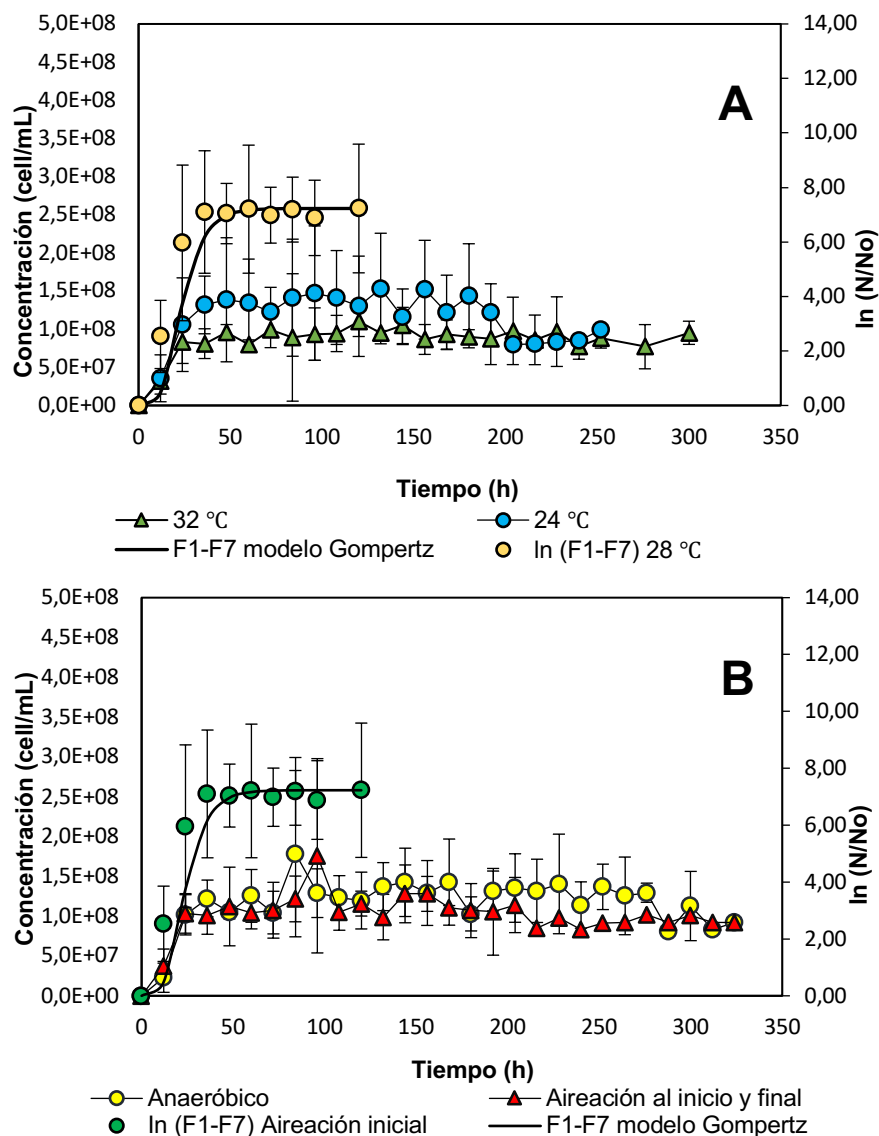


Figura 21: (A) Promedio del perfil de biomasa (cell/mL) a diferentes temperaturas 24, 28 y 32°C. (B) Promedio del perfil de biomasa (cell/mL) con diferentes estrategias de aireación: Aireación inicial, anaeróbica y, aireación al inicio y final de la fase exponencial. En ambas gráficas se representa la curva de crecimiento (F1-F7) de la *Saccharomyces cerevisiae* normalizada con el modelo Gompertz ($A=2,23$; $\mu_m=0,29$; $e=3$, $\lambda=12$)⁹⁸.

En la *Tabla 24*, se muestran las concentraciones de los MCFA a 28 °C y aireación inicial en el rango de 1,48-37,55 mg/L desde el inicio de la fermentación hasta el final, con concentraciones de C_{8:0} siendo el más alto en todo el curso de la fermentación. C_{6:0} y C_{8:0} tuvieron concentraciones más altas que los otros analitos.

Tabla 24: Fermentaciones agrupadas por efectos (24, 28 y 32 °C, anaeróbica, aireación inicial, aireación al inicio y final de la fase exponencial). Concentraciones (mg/L) de MCFA y LCUFA y la relación MCFA/LCUFA en la fermentación alcohólica del vino *Carménère*.

Analitos		Progreso de la fermentación (horas)					
		0	24	48	72	96	120
24 °C	C _{6:0}	ND	1± ^a	1± ^a	0,8±0,2	1± ^a	1± ^a
	C _{8:0}	ND	2±1	2±2	2±2	2±2	3±3
	C _{10:0}	ND	2±2	4± ^a	5± ^a	8± ^a	9± ^a
	MCFA	0	4,9	7,4	7,9	9,2	13,7
	C _{18:1}	0,2± ^a	1±1	0,9 ± ^a	1± ^a	1± ^a	2± ^a
	C _{18:3}	3,2±0,2	3±3	2± ^a	5± ^a	6± ^a	8± ^a
	LCUFA	3,4	4,5	3,2	6,7	7,2	10,1
	MCFA/LCUFA	---	1,1±0,9	2,3±0,6	1,2±0,3	1,3±0,3	1,4±0,3
28 °C y aireación inicial	C _{6:0}	4±2	10±6	21±18	14±12	15±11	28±16
	C _{8:0}	2±1	22±18	38±11	34±18	33±16	37±9
	C _{10:0}	4±2	12±8	15±4	15±9	14±6	18±5
	C _{12:0}	1,5±0,3	2±1	4±2	3±1	2±1	4±3
	MCFA	10,8	46,7	76,9	65,4	64,5	86,9
	C _{14:1}	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
	C _{16:1}	2,65±0,01	8±13	37±7	24±13	15±12	20±16
	C _{18:1}	12,52±0,02	13±6	10±8	6±5	8±5	12±8
	C _{18:2}	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
	C _{18:3}	9,44±0,01	8±8	7±1	4±1	8±2	6±4
	LCUFA	24,6	29,5	54,0	33,7	31,3	38,6
	MCFA/LCUFA	0,4±0,1	2±1	1,4±0,5	2±1	2±1	2±1
32 °C	C _{6:0}	ND	0,79± ^a	0,66± ^a	0,65± ^a	0,64±0,05	0,64±0,03
	C _{8:0}	ND	1,3±0,5	1,1±0,4	1,12±0,09	1,0±0,3	1,1±0,2
	C _{10:0}	ND	0,8±0,4	0,8±0,3	0,7±0,2	0,68±0,06	0,70±0,01
	MCFA	---	2,8	2,5	2,4	2,4	2,4
	C _{18:1}	0,41±0,19	0,44±0,07	0,40±0,05	0,45±0,04	0,39±0,03	0,39±0,02
	C _{18:3}	1±1	0,2±0,1	0,21±0,08	0,24±0,10	0,20±0,05	0,16±0,01
	LCUFA	1,8	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6
		MCFA/LCUFA	---	4±1	4±1	3,6±0,6	4,0±0,6
Anaeróbica	C _{6:0}	1,7± ^a	0,7±0,1	6±8	3±4	1,3± ^a	0,8±0,2
	C _{8:0}	1,1± ^a	2±1	ND	8±14	1,3±0,5	1,4±0,4
	C _{10:0}	1,9± ^a	1,3±0,8	4±7	6±10	0,7±0,2	3±4
	MCFA	4,7	3,9	10,4	17,0	3,3	4,9
	C _{18:1}	1±1	0,6±0,2	0,9±0,6	1,0±0,9	0,42±0,05	0,6±0,3
	C _{18:3}	2±2	0,8±0,7	0,4±0,4	0,9±0,8	0,2±0,1	0,6±0,6
		LCUFA	3,5	1,5	1,3	1,9	0,7
	MCFA/LCUFA	1±1	2±2	8±10	9±11	5±1	4±4
Aireación al inicio y final de la fase exponencial	C _{6:0}	ND	0,8±0,2	1± ^a	0,6± ^a	1± ^a	0,9± ^a
	C _{8:0}	ND	1,4±0,4	1,6±0,2	1,3±0,7	1,4±0,4	1,4±0,2
	C _{10:0}	0,9± ^a	2±2	2±1	1±1	2±2	1±1
	MCFA	0,9	3,8	4,2	3,2	4,3	3,6
	C _{18:1}	0,6±0,4	2±3	1±2	1±1	1±2	1±1
	C _{18:3}	9±12	6±9	4±6	6±7	3±4	3±5
		LCUFA	9,3	7,8	5,3	6,8	4,3
	MCFA/LCUFA	0,1±0,1	0,5±0,7	0,8±0,9	0,5±0,5	1±1	0,8±1

Datos expresados como la medida ± desviación estándar. ND= No detectado. ^aÚnica información.

MCFA: Ácidos grasos de cadena media (C_{6:0}, C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}).

LCUFA: Ácidos grasos de cadena larga insaturados (C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1}, C_{18:2}, C_{18:3}).

Valores por debajo del Límite de Cuantificación del Método (<LQM).

Uno de los efectos negativos de la alta concentración de los MCFA en la fermentación es que son tóxicos para el metabolismo de la levadura y pueden impedir el crecimiento de la levadura¹⁴. Sin embargo, a pesar de los altos niveles encontrados en las fermentaciones (F1-F7), terminaron normalmente. Posiblemente, porque los LCUFA también tuvieron una gran proporción y pudieron influir en este resultado.

La relación de los MCFA/LCUFA (28 °C y aireación inicial) generalmente fue incrementando desde el inicio hasta el final de la fermentación. Después de 24 horas, siempre fue mayor que 1,5 (ver *Tabla 24* y *Figura 22*). Se determinó que los LCUFA estaban en el rango de 2,65-36,57 mg/L, siendo las concentraciones de C_{16:1} las más altas en comparación con los otros analitos durante el proceso de fermentación alcohólica, y que representan el 67,70% del total de LCUFA a las 48 h. Al comienzo de la fermentación, el contenido de C_{18:3} disminuyó rápidamente, esto puede estar relacionado con su incorporación en la estructura de la levadura celular, ya que esta reducción coincide con el rápido aumento en el número de células viables¹³.

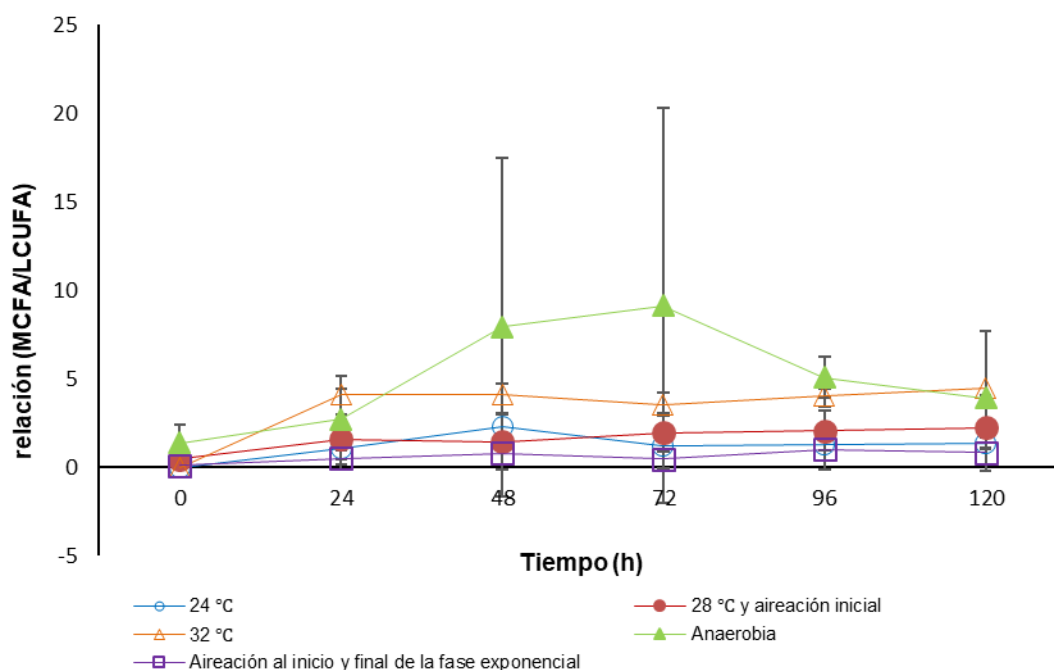


Figura 22: Relación MCFA/LCUFA para todos los tratamientos de temperatura y aireación.

4.1.2.3 Efecto de la temperatura en el contenido de ácidos grasos

La producción de los MCFA en las fermentaciones normales a 28 °C se observa en la *Figura 23(B)*, para cada ácido graso particular y para todos los MCFA. El aumento de estas concentraciones, desde el inicio hasta el final de la fermentación, fue similar al comportamiento encontrado en estudios previos^{10,13,17,99}. Las *Figuras 23(A)* y *23(C)* muestran la producción de MCFA a temperaturas de 24 y 32 °C respectivamente.

A 24 °C, la relación MCFA/LCUFA fue superior a 1 hasta el final de la fermentación, excepto en la hora cero, donde no se detectaron los MCFA, y a las 48 h, la relación MCFA/LCUFA fue mayor que 2 que coincide con el final de la fase exponencial (ver *Tabla 24* y *Figura 22*).

A 32 °C, las concentraciones de MCFA fueron muy bajas con respecto a las obtenidas a 28 °C, y se mantuvieron constantes durante al menos 120 h, como se muestra en la *Figura 23(C)*. La relación MCFA/LCUFA fue superior a 3,5 de 24 a 120 h, excepto en la hora cero, en donde no se detectaron los MCFA (ver *Tabla 24*). A 32 °C, la relación fue aproximadamente cuatro veces mayor que en 24 y 28 °C, lo que significa que la proporción de MCFA fue mucho mayor que la de los LCUFA. Por lo tanto, una temperatura de 32 °C es demasiado alta para *Saccharomyces cerevisiae*, alcanzando un comportamiento de fermentaciones atascadas y ralentizadas.

El perfil de los LCUFA en fermentaciones a 28 °C se indica en la *Figura 23(E)*. Además, los LCUFA a 24 °C y 32 °C en las *Figuras 23(D)* y *23(F)*.

La concentración de los LCUFA (C_{18:1} y C_{18:3}) a 32 °C disminuyó ligeramente a lo largo del proceso de fermentación (*Figura 23(F)*). Por lo tanto, se puede considerar que los LCUFA son usados selectivamente por levaduras durante la fermentación alcohólica, o como fuente de carbono, o lípidos de membrana.

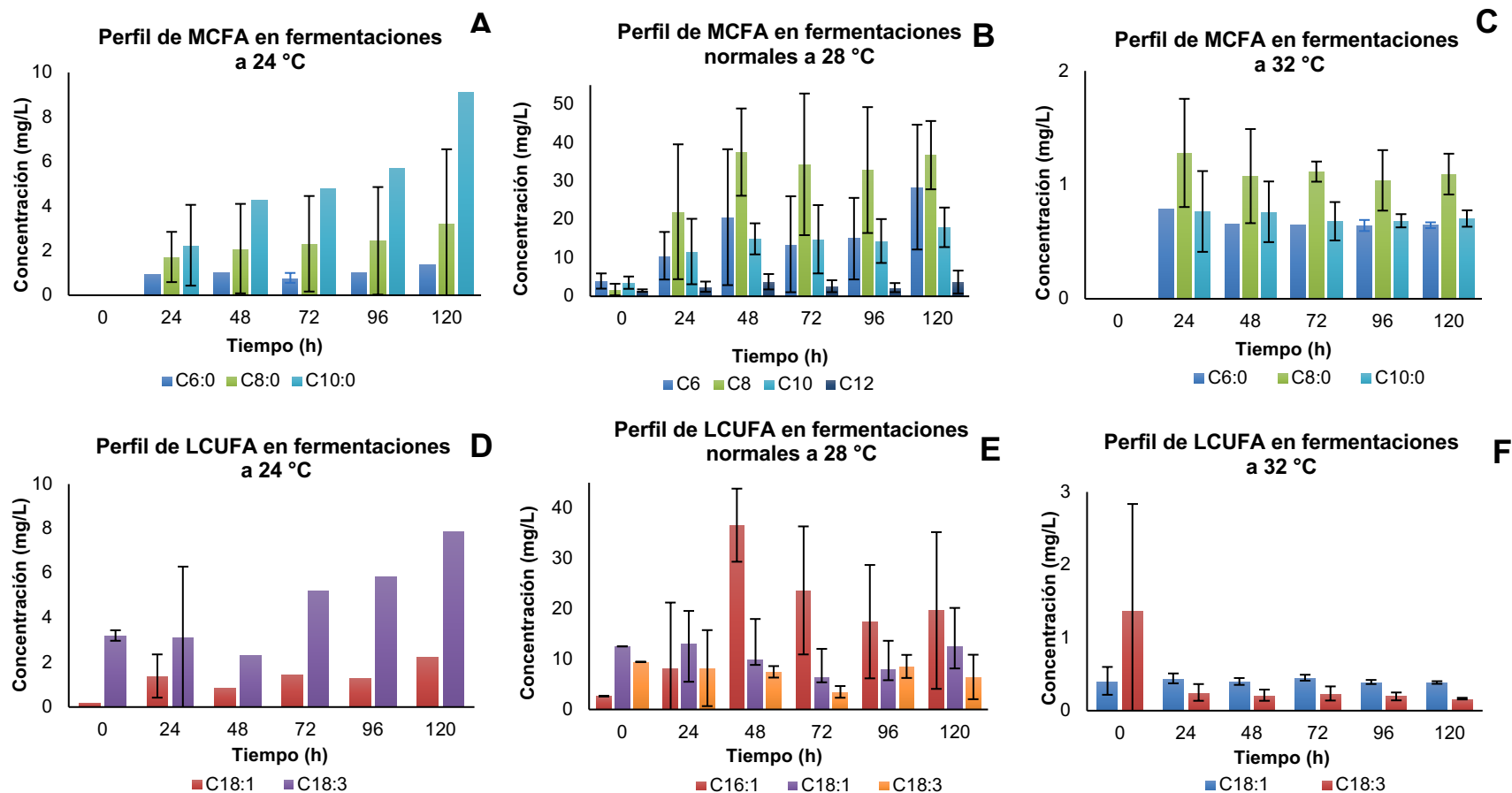


Figura 23: (A) Perfil de MCFA en fermentaciones a 24 °C. (B) Perfil de MCFA en fermentaciones a 28 °C. (C) Perfil de MCFA en fermentaciones a 32 °C. (D) Perfil de LCUFA en fermentaciones a 24 °C. (E) Perfil de LCUFA en fermentaciones a 28 °C. (F) Perfil de LCUFA en fermentaciones a 32 °C.

Los analitos C_{14:1}, C_{18:2} no se graficaron ya que sus valores estuvieron por debajo del límite de cuantificación. El C_{14:1} no había sido cuantificado antes en otras cepas como *Viura*, *Cabernet Sauvignon*, *Tempranillo*, *Pinot noir* y *Syrah*^{26,29,100}.

Yunoki *et al.*²⁹ y Beltran *et al.*¹⁷ no detectaron el C_{18:2} en fermentaciones a 13 °C y 25 °C; similarmente ocurrió en esta investigación, el C_{18:2} no se detectó en las fermentaciones a 24, 28 y 32 °C.

En la producción de los LCUFA durante la fermentación alcohólica del vino *Carménère*, solo C_{18:3} aumentó hasta el final de la fermentación (3,2-8,0 mg/L) a 24 °C, lo cual es muy interesante porque el ácido linolénico es un ácido graso omega-3, y tiene muchas propiedades beneficiosas. Este hallazgo debe ser confirmado y validado utilizando otras variedades de mosto.

No obstante, a los 28 °C el C_{18:3} disminuyó su concentración hasta las 72 h, luego aumentó hasta el final de la fermentación, este es un resultado que se esperaba porque tiene un comportamiento similar a estudios previos^{10,13,17,99}. Finalmente, a 32 °C el C_{18:3} permaneció casi constante, indicando que a esta temperatura la síntesis de este ácido graso no se ve afectada.

En resumen, a 24 y 32 °C el contenido de los MCFA y los LCUFA fueron mucho más bajos en comparación con el contenido a 28 °C. Esto puede estar directamente relacionado con la variedad *Carménère* y/o con determinadas cepas de levadura, o con la sinergia con el oxígeno. Además, puede estar asociado a una temperatura óptima para condiciones específicas y la cepa de levadura.

Los resultados de estos ácidos grasos en esta tesis fueron consistentes con los de Beltran *et al.*¹⁷, quienes cuantificaron analitos como el C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:1}, C_{16:1}, C_{18:1} a temperaturas muy similares (25 °C) a las propuestas (24 y 28 °C).

4.1.2.4 Efecto de la aireación sobre el contenido de ácidos grasos

El proceso de fermentación en sí no requiere oxígeno. Incluso en presencia de oxígeno la *Saccharomyces cerevisiae* fermenta preferencialmente. Sin embargo, pequeñas cantidades de oxígeno pueden favorecer indirectamente la fermentación permitiendo la biosíntesis de

esteroles y ácidos grasos insaturados de cadena larga. Además, las condiciones anaeróbicas favorecen la acumulación de ácidos grasos tóxicos ($C_{8:0}$ y $C_{10:0}$)^{3,101}.

El contenido de los MCFA en la fermentación con aireación inicial (15 min) fue inferior a 90 mg/L a las 120 h, como se muestra en la *Figura 24(B)*. Además, el perfil de MCFA para las fermentaciones anaeróbicas (*Figura 24(A)*) y para las fermentaciones con aireación al inicio y final de la fase exponencial (*Figura 24(C)*) fueron menores de 5 y 4 mg/L, respectivamente a las 120 h.

El contenido de $C_{8:0}$ fue casi el doble de $C_{6:0}$ y $C_{10:0}$, pero $C_{12:0}$ fue muy bajo y constante durante toda la fermentación con aireación inicial (*Figura 24(B)*).

La composición de los ácidos grasos en la membrana es altamente variable y se ve claramente afectada por factores ambientales como la temperatura, el oxígeno, la limitación de nutrientes y la tasa de crecimiento¹⁷, en vista de este hecho, como resultado del metabolismo de las levaduras, la composición de ácidos grasos del medio también depende de las condiciones de fermentación como la temperatura estudiada en esta tesis (24, 28 y 32 °C) y estrategias de aireación (anaeróbica, aireación inicial, y aireación al inicio y final de la fase exponencial).

Bajo la condición anaeróbica, la relación MCFA/LCUFA está entre 1,36 y 9,13 (*Tabla 24* y *Figura 24(A)*). En comparación con la relación en la fermentación normal, esto fue desproporcionadamente alto, lo que confirma que la aireación mejora la fermentación.

En la *Figura 24(C)* se observa que, a pesar de la condición de la aireación al comienzo y al final de la fase exponencial, los MCFA permanecieron bajos e invariantes durante el transcurso de la fermentación alcohólica. Esto podría indicar que el efecto del oxígeno en la producción de MCFA no es tan importante como el de la temperatura.

El oxígeno molecular es necesario para la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga esenciales para la síntesis y función de la membrana celular³. El contenido de los LCUFA a 28 °C y la aireación inicial también fue inferior a 40 mg/L al final de la fermentación, como se muestra en la *Figura 24(E)*, pero esto es consistente porque la población de levaduras está aumentando y se beneficia de más oxígeno en el medio.

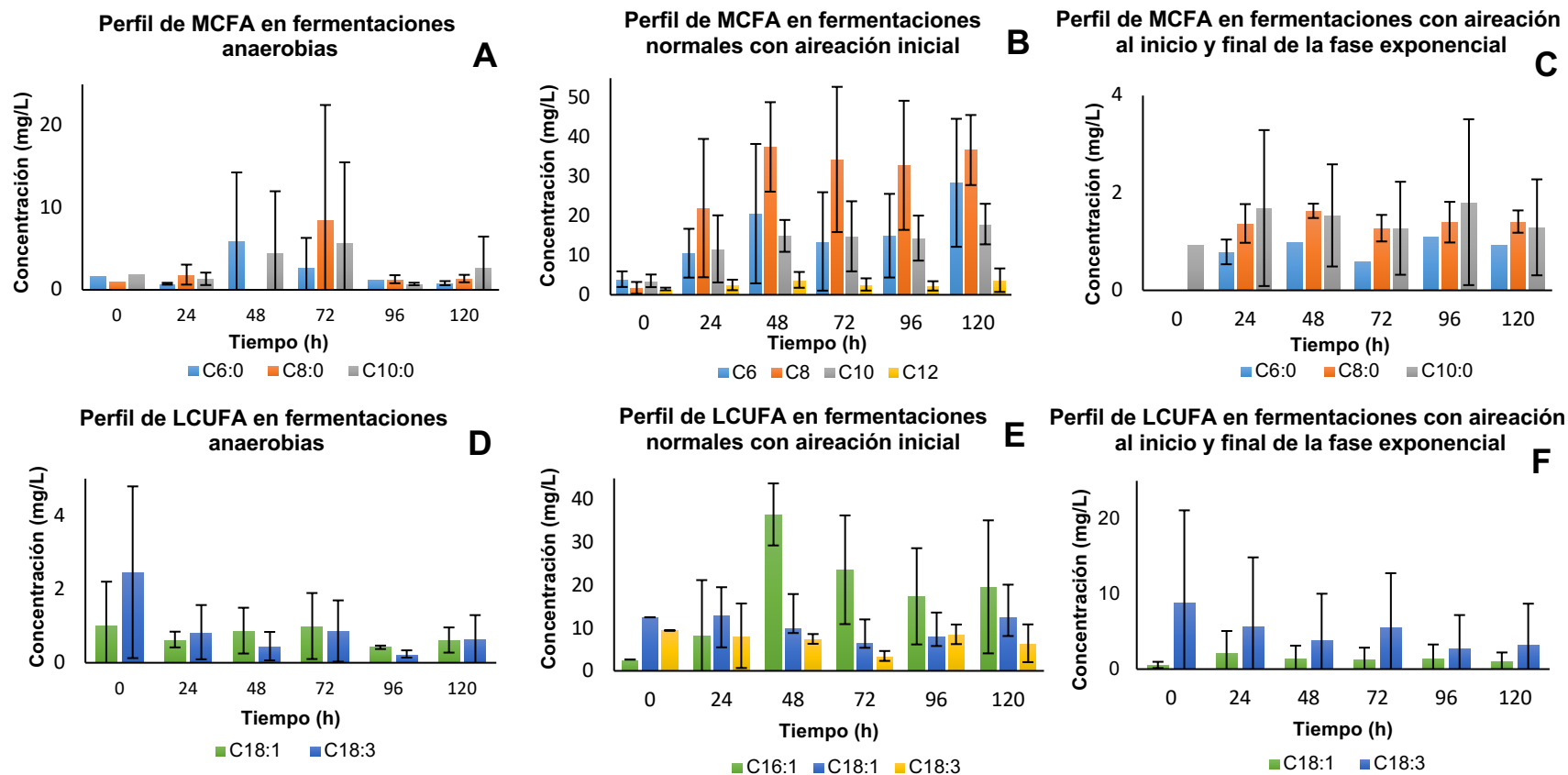


Figura 25: (A) Perfil de MCFA en fermentaciones anaeróbicas. (B) Perfil de MCFA en fermentaciones normales con aireación inicial. (C) Perfil de MCFA con aireación inicial y al final de la fase exponencial. (D) Perfil de LCUFA en fermentaciones anaeróbicas. (E) Perfil de LCUFA en fermentaciones normales con aireación inicial. (F) Perfil de LCUFA con aireación inicial y al final de la fase exponencial.

Adicionalmente, el perfil de los LCUFA en las fermentaciones anaeróbicas fue inferior a 3,5 mg/L y decreció a lo largo del curso de la fermentación (*Figura 24(D)*). En la *Figura 24(F)*, el perfil de los LCUFA fue inferior a 10 mg/L y similarmente ocurre este comportamiento en la *Figura 24(D)*, que también es consistente que sea un poco mayor las concentraciones en la *Figura 24(F)* porque el oxígeno favorece el crecimiento de las levaduras. Sin embargo, este valor está muy por debajo de las concentraciones encontradas utilizando la estrategia definida como aireación inicial (fermentación normal). De nuevo, la relación entre la temperatura y el oxígeno podría ser un indicador de problemas en la fermentación.

Específicamente, en la *Figura 24(E)* se puede observar que el contenido de C_{16:1} tuvo un incremento mucho mayor con respecto a otros dos analitos, mientras que los C_{18:1} y C_{18:3} permanecieron constantes. Bajo la condición anaeróbica (*Figura 24(D)*), los LCUFA fueron casi constantes y en comparación con la condición de fermentación normal, tuvieron una producción muy baja, lo que concuerda con los resultados previos obtenidos por Mauricio *et al.*²². Finalmente, se observó que el C_{18:3} comenzó con una concentración más alta que C_{18:1}, pero disminuyó durante el proceso de fermentación con la aireación inicial y la aireación al final de la fase exponencial (*Figura 24(F)*).

Previos resultados mostraron que la adición de oxígeno o de aireación afectó principalmente la cinética al final de la fermentación al sintetizar los ácidos grasos insaturados y esteroides, y así aumentando la resistencia de la levadura al etanol^{23,102}. Los resultados obtenidos en esta investigación fueron consistentes con estas observaciones.

En resumen, bajo condiciones anaeróbicas, el contenido de los MCFA (que es tóxico para la levadura) fue mayor que el contenido de los LCUFA (que son necesarios para la supervivencia de la levadura), por lo tanto, siempre es mejor mantener aireación en el sistema. En este trabajo, fue más favorable mantener la aireación al inicio y al final de la fase exponencial durante 15 minutos, de acuerdo con Bardi *et al.*²⁴, y Blateyron y Sablayrolles²³, debido a que la relación de los MCFA/LCUFA usualmente fue menor que 1 durante el transcurso de fermentación alcohólica del vino *Carménère*.

El grado de insaturación de los ácidos grasos se vio afectado por la temperatura en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo, un mayor grado de insaturación no aseguró un buen desempeño en las fermentaciones con las condiciones propuestas en esta tesis.

Las concentraciones de los MCFA y los LCUFA a 24 °C y 32 °C nunca excedieron los niveles de producción observados en la fermentación normal (28 °C y aireación inicial).

La relación de los MCFA/LCUFA incrementó notablemente a 32 °C. Con base en los resultados presentados, se sugiere trabajar bajo las condiciones de fermentación entre 24-28 °C y no 32 °C. Adicionalmente, la relación de los MCFA/LCUFA aumentó considerablemente para la estrategia anaeróbica. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados, la aireación inicial y al final del tratamiento de fase exponencial parecen ser la mejor opción para llevar a cabo una fermentación.

Como recomendaciones, podría ser interesante seguir la investigación y comparar los resultados presentados con resultados obtenidos en diferentes variedades de uva y diferentes cepas de levadura, también comparar el efecto conjunto de la temperatura y el oxígeno en la producción de compuestos volátiles.

4.1.3 Determinación de ácidos grasos por IR-TF

Los espectros de los mostos en fermentación se obtuvieron de dos formas: Como muestra seca y como muestra húmeda como se describió en la metodología (capítulo 3).

A continuación, se muestra en la *Figura 25* un espectro de absorción de muestra húmeda con bandas características de los ácidos grasos en muestras de mostos en fermentación tomados cada 12 horas en un IR-TF(MIR).

Las bandas de absorción de los espectros tomados representan vibraciones de estiramiento simétricos de grupos metil (CH_3); estiramientos simétricos y asimétricos de grupos metilenos (CH_2); vibraciones de flexión tipo tijereo CH_2 , CH_3 ; flexión tipo balanceo $=\text{C}-$

H característico de los ácidos grasos insaturados junto con las flexiones fuera del plano -CH=CH-, y estiramientos de -C-O, O-C-C-, C-C(=O)-O de ésteres.

En un estudio realizado por Nobrega *et al*,¹⁰³ mostró que no hubo diferencias en la forma del perfil de transmitancia en los espectros de IR-TF para algunos ácidos grasos saturados. Sin embargo, si hubo diferencias en las intensidades de las bandas, y de esta manera se logró identificar cada ácido graso saturado. Similarmente, esto ocurre para los espectros de ácidos grasos insaturados pero las bandas de absorción asociadas a los dobles enlaces logra mayores diferencia que hace más factible identificarlos.

Se prepararon seis soluciones para determinar el rango lineal para cada ácido graso abarcando el rango de concentración que deben estar los analitos en las muestras, la preparación de estas soluciones se describe en la metodología (*Capítulo 3*).

El rango para cada analito en el IR-TF fue: C_{6:0}= 0,1-25,0 mg/L; C_{8:0}= 0,1-20,0 mg/L; C_{10:0}= 0,1-45,0 mg/L; C_{12:0}= 0,1-30,0 mg/L; C_{14:1}= 0,1-5,0 mg/L; C_{16:1}= 0,1-20,0 mg/L; C_{18:1}=0,1-25,0 mg/L C_{18:2}=0,1-70,0 mg/L C_{18:3}=0,1-25,0 mg/L.

Todos los espectros de las muestras tomados por IR-TF se utilizaron para el análisis quimiométrico.

4.2 Determinación de aminoácidos

4.2.1 Validación del método cromatográfico HPLC-UV

Para validar el método se determinó algunas cifras de mérito: Límites de detección y cuantificación, linealidad, exactitud (con estudios de recuperación), a continuación, se muestran los resultados obtenidos.

Las cifras de mérito determinadas para este método cromatográfico las realizó Mauricio Antonio Valderas Solaligue para optar por el grado de Ingeniero Agrónomo presentado el 12 de Septiembre de 2013 en Pontificia Universidad Católica de Chile⁸⁴.

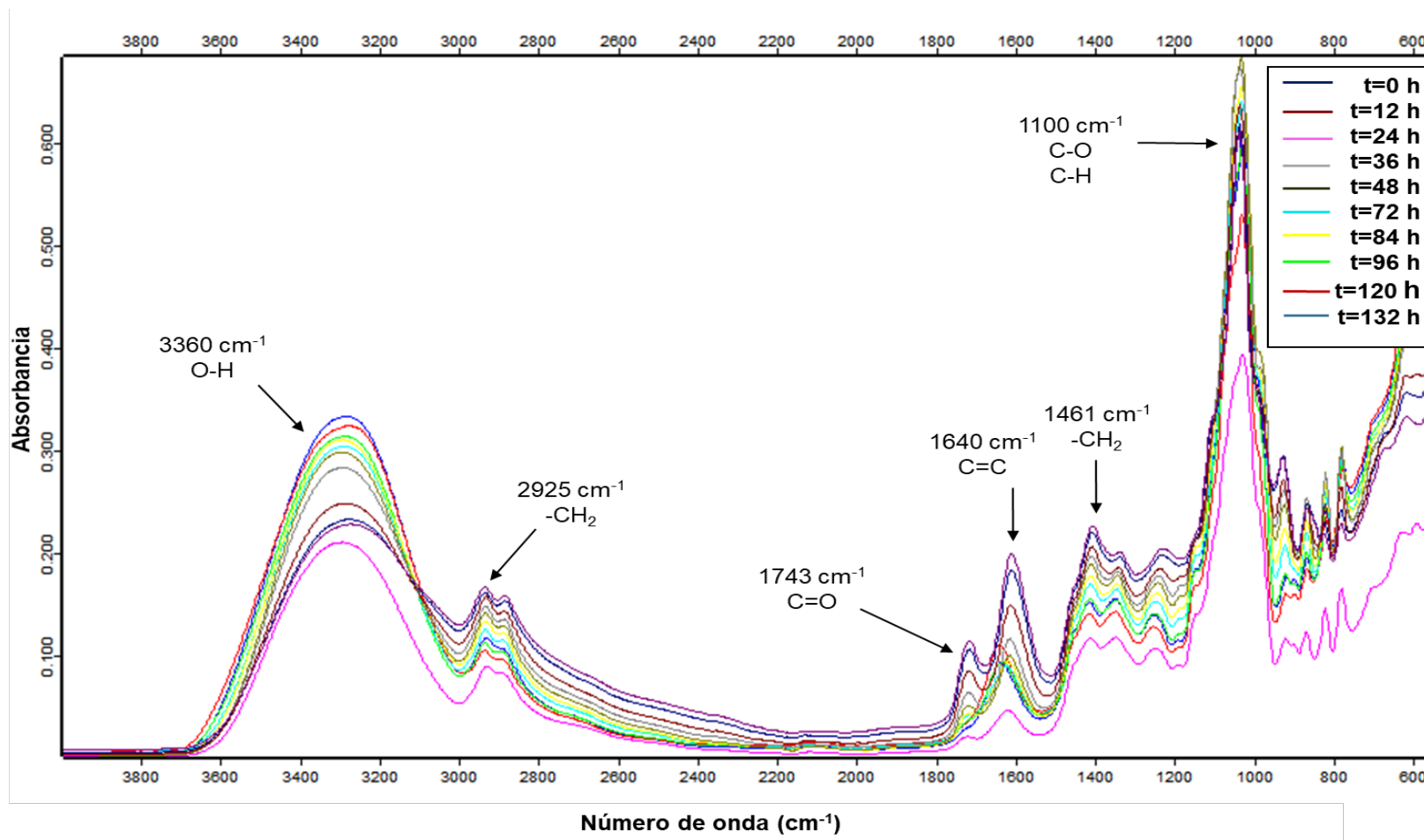


Figura 26: Espectros de absorción molecular de mosto en fermentación real (cepa *Carménère*) tomado cada 12 horas a escala de laboratorio bajo condiciones normales de operación. Muestra húmeda.

Para identificación y cuantificación de los aminoácidos en mosto y vino mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-UV) se empleó como derivatizante el agente Etoximetilenmalonato de dietilo (EMMDE).

Para la identificación de los aminoácidos se utilizó un kit de 18 aminoácidos, los cuales se compararon con la secuencia de elución obtenida por Valderas⁸⁴, mostrando plena consistencia en el orden de elución.

En la *Figura 26*, se muestran dos cromatogramas superpuestos, en azul la matriz de mosto *Carménère* con el mix de 18 aminoácidos y en rojo, solo la matriz de mosto sin el estándar mix. Además, se pudo separar e identificar claramente los aminoácidos de interés, el pico número dos (**2**) el ácido glutámico, el pico cuatro (**4**) glutamina, el pico ocho (**8**) arginina, y el pico nueve (**9**) alanina.

4.2.1.1 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron en la tesis de Mauricio Antonio Valderas Solaligue⁸⁴, un resumen de los resultados se pueden ver en la *Tabla 25*, demostrando que el método posee la sensibilidad para determinar los aminoácidos presentes en las muestras de mostos en fermentación.

Tabla 25: Límites de detección y cuantificación del método en mg/L⁸⁴.

Aminoácido	LDM (mg/L)	LQM (mg/L)
Ácido glutámico	0,00072	0,0024
Glutamina	0,00006	0,0002
Arginina	0,00012	0,0004
Alanina	0,00012	0,0004

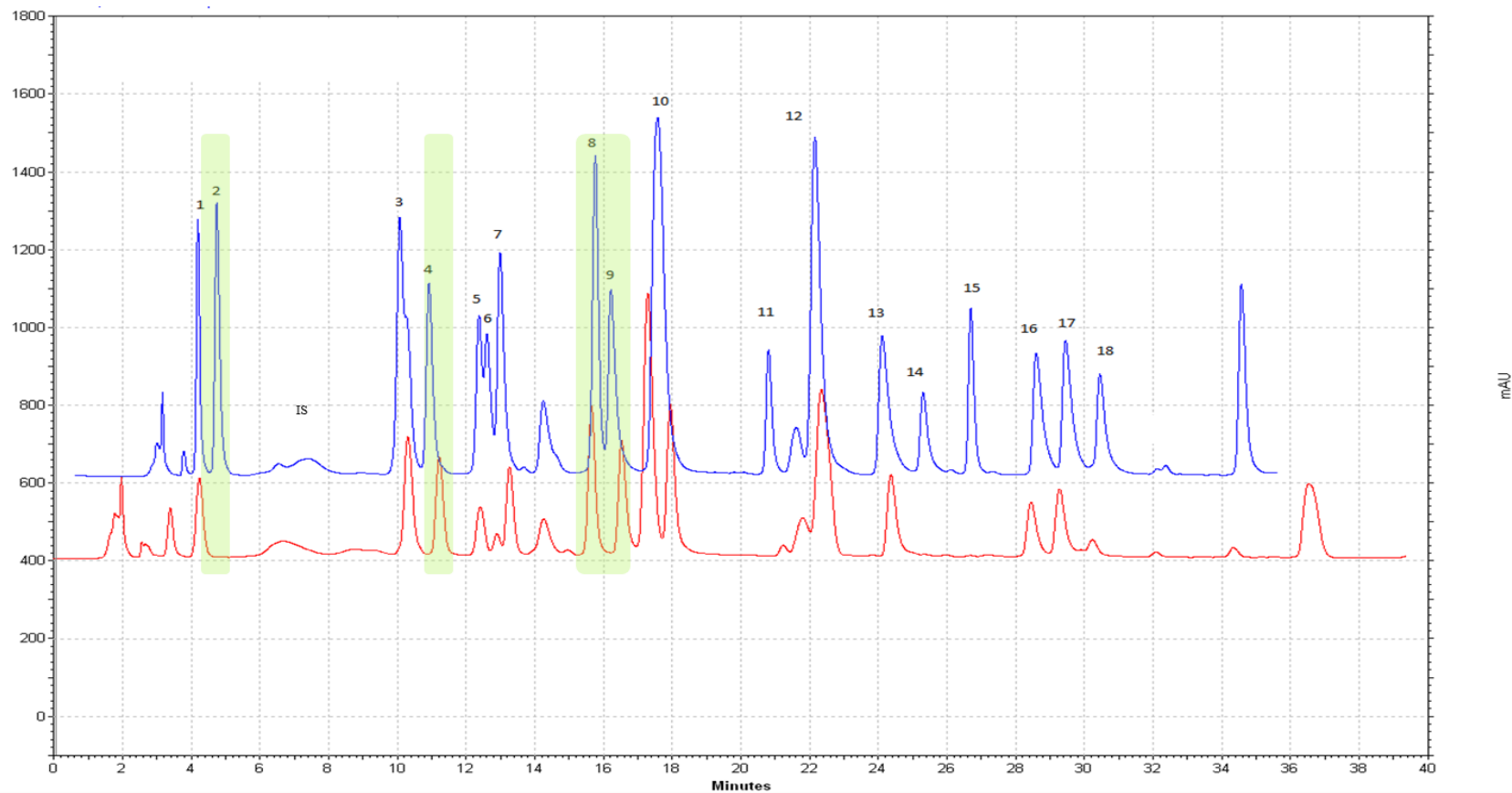


Figura 27: Identificación de aminoácidos: Cromatograma de una matriz de mosto *Carménère* (rojo) comparada con una matriz de mosto con adición de kit de 18 aminoácidos (azul). Medido a 280 nm con un detector UV: (1) Acido aspártico, (2) **Acido glutámico**, (IS) Estándar interno, (3) Asparagina+Serina, (4) **glutamina**, (5) histidina, (6) glicina, (7) treonina, (8) **arginina**, (9) **alanina**, (10) Prolina, (11) tirosina, (12) ión amonio, (13) valina, (14) metionina, (15) cisteína, (16) isoleucina, (17) leucina+triptofano, (18) fenilalanina⁸⁴.

4.2.1.2 Linealidad

La linealidad se considera como la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Para evaluar éste parámetro, se preparó una curva de calibración para cada uno de los aminoácidos.

Ésta curva de calibración relaciona las respuestas de los aminoácidos expresada en áreas con la concentración de los mismos. Con los valores obtenidos se obtiene la ecuación de la recta ' $y = mx + a$ ', donde "y" es el área, "m" la concentración, "b" la pendiente y "a" el intercepto. El coeficiente de regresión lineal r, refleja el grado de relación entre la concentración (variable x) y el área (variable y). El valor máximo de r es uno, por lo tanto, si éste es cercano a la unidad implica que existe una buena correlación.

En la *Tabla 26*, aparece el intervalo de concentración evaluado en cada aminoácido, la ecuación de regresión lineal y coeficiente de determinación en matriz de mosto. Se observa una adecuada linealidad en todos los casos, con un coeficiente de correlación superior a 0,995.

Tabla 26: Resultados de la calibración del método cromatográfico. Intervalos de concentración (mg/L), intercepto, pendiente de la recta y coeficiente de determinación para cada aminoácido⁸⁴.

Aminoácido	Intervalos de concentración (mg/L)		Intercepto	Pendiente	r ²
Ácido glutámico	18,70	125,0	18,41	577,17	0,999
Glutamina	4,95	179,0	4,03	411,19	0,999
Arginina	7,80	95,20	127,30	877,13	0,999
Alanina	31,70	165,0	574,02	531,38	0,999

4.2.1.3 Exactitud

Para determinar la exactitud del método, se realizaron tres niveles de enriquecimiento en mosto, todos presentaron recuperaciones cercanas al 95%, ver *Tabla 27*.

Tabla 27: Resultados de la calibración del método cromatográfico. Intervalos de concentración (mg/L), intercepto, pendiente de la recta y coeficiente de determinación para cada aminoácido.

Aminoácido	% Recuperación			$\bar{X}(\%R)$
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	
Ácido glutámico	92,6	91,6	89,7	91,3
Glutamina	96,4	97,6	96,8	96,9
Arginina	95,4	97,4	94,2	95,6
Alanina	92,3	95,8	97,4	95,2

El porcentaje de recuperación fue satisfactorio para las pruebas realizadas, utilizando como criterio de aprobación, recuperaciones entre 70-120%.

Se concluye que el método es adecuado para cuantificar los aminoácidos de interés.

Con respecto a la prolina, no se pudo determinar esta cifra de mérito ya que su coeficiente de determinación no pasaba el criterio de aceptación. También, debido a los altos niveles presentes en la matriz de mosto, afectaba la sensibilidad de los otros aminoácidos. Se recomienda para la cuantificación y determinación de cifras de mérito de este analito realizar dilución de 1:10 a las muestras.

4.2.2 Cuantificación de aminoácidos por HPLC-UV

La cuantificación en las muestras de mosto real (cepa *Carménère*) se realizó para cinco aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia: Ácido glutámico, alanina, arginina y glutamina. con una curva de calibración y estándar interno (ácido L-2-aminoadipico), la prolina no pudo ser cuantificada. Se requirió un tratamiento previo de la muestra, derivatización con EMMDE. Los lavados secuenciales de todo el sistema, permitieron evitar efectos acumulativos de la interferencia por azúcar, ya que los mostos en sus primeras etapas de fermentación cuentan con contenidos de glucosa y fructosa aproximadamente de 227 g/L logrando así una cuantificación de los analitos adecuada.

Para el estudio de los aminoácidos en mostos en fermentación se seleccionaron cinco de ellos anteriormente mencionados, debido a la importancia para la levadura y porque son

los que se encuentran en mayor concentración en el proceso de fermentación alcohólica del vino (ver *Capítulo 1*).

4.2.2.1 Fermentaciones normales

Ocho fermentaciones fueron estudiadas a condiciones de operación normal (28 °C, FAN 250 mg/L, concentración de azúcar inicial 227 g/L, saturación inicial de oxígeno, pH a 3,5).

En la *Figura 27*, se puede observar el promedio de la biomasa para las ocho fermentaciones. Las fermentaciones tuvieron una fase de adaptación (lag) hasta las 12 h, luego una fase exponencial o de crecimiento de las levaduras hasta aproximadamente 40 h, luego una fase estacionaria, pero con una leve fluctuación hasta las 120 h, corroborando un comportamiento normal en su proceso de fermentación.

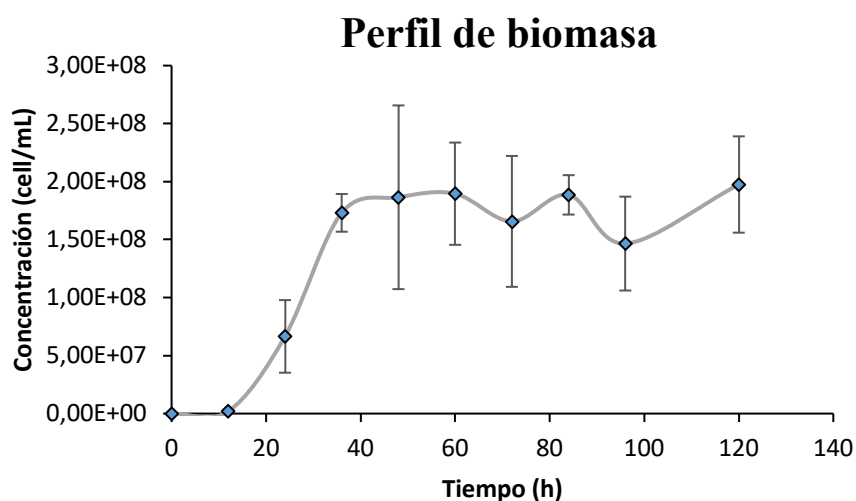


Figura 28: Perfil de biomasa de ocho fermentaciones alcohólicas.

Para las ocho fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère* se obtuvieron concentraciones para cada analito de interés en función del tiempo, como se muestra en la *Tabla 28*.

A los valores expresados en la tabla anteriormente mencionada, se les aplicó el test Q estadístico (P=0,05), donde solo se rechazaron dos valores, el de la F8 a t=48 h para la glutamina y el de la F1 a t=120 h para la alanina. Como criterio de aceptación: Si el valor de Q calculado supera el valor crítico, se rechaza el valor sospechoso.

Tabla 28: Concentraciones (mg/L) de aminoácidos (Ácido glutámico, glutamina, alanina, arginina) en ocho fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère*¹⁰⁴.

Aminoácidos	Tiempo (horas)	Fermentación								$(\bar{X} \pm s)^*$
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Ácido glutámico	0	128,40	128,20	128,10	128,43	281,77	281,97	281,45	281,91	205,03±82,05
	24	116,86	64,55	ND	76,16	ND	ND	ND	136,14	98,43±33,69
	48	ND	75,22	ND	ND	265,48	ND	ND	163,82	168,17±95,21
	72	183,30	214,58	210,78	355,28	134,16	381,90	ND	454,56	276,4±119,8
	96	164,17	253,85	226,57	306,67	417,60	ND	ND	467,87	306,12±116,45
	120	236,08	ND	300,90	422,34	459,63	449,42	445,90	473,61	398,27±91,92
Glutamina	0	23,18	23,27	23,07	23,17	22,47	22,50	22,98	22,45	22,89±0,35
	24	1,57	ND	128,90	112,87	125,23	109,26	99,05	4,56	83,06±55,55
	48	ND	ND	ND	ND	24,44	23,63	24,70	VR	24,26±0,56
	72	23,19	15,10	16,45	13,05	23,18	31,41	34,11	20,98	22,18±7,53
	96	11,65	15,35	14,65	9,83	18,84	20,01	24,81	14,40	16,19±4,83
	120	8,24	12,35	10,74	7,25	9,43	9,70	12,61	8,94	9,91±1,89
Alanina	0	46,67	46,51	46,93	46,87	46,83	46,65	46,51	46,53	46,69±0,17
	24	38,33	39,66	34,46	41,89	29,73	34,02	37,37	15,86	33,91±8,21
	48	3,18	3,89	3,68	4,25	3,71	12,12	11,74	11,41	6,75±4,16
	72	22,18	23,54	24,47	53,95	11,25	80,00	81,42	75,35	46,52±29,46
	96	24,51	42,49	39,41	63,68	78,50	89,31	89,67	79,85	63,43±25,03
	120	VR	60,82	58,38	91,82	91,81	93,77	104,90	81,91	83,34±17,56
Arginina	0	109,88	109,86	109,71	109,85	115,35	115,28	115,39	115,43	112,6±2,96
	24	51,30	47,59	41,96	68,99	52,15	51,04	59,76	43,44	52,03±8,82
	48	9,94	11,90	9,60	13,13	22,69	21,13	27,11	17,29	16,6±6,5
	72	24,67	19,17	23,17	18,08	20,36	28,48	19,72	21,12	21,85±3,43
	96	20,19	22,64	24,95	12,24	26,10	24,10	22,19	15,99	21,05±4,75
	120	26,70	22,72	24,07	17,39	20,46	20,56	22,20	15,36	21,18±3,61

*(Media ± desviación estándar). Triplicado de muestra.

VR= Valores rechazados

ND = No detectado

De la *Tabla 28*, cabe destacar que el más abundante de este grupo de aminoácidos fue el ácido glutámico con un promedio de 398, 27 mg/L al final de la fermentación (120 h) y el

menos abundante fue la alanina con un promedio de concentración de 6,75 mg/L casi en la mitad de la fermentación (t=48 h).

Los rangos de concentración hallados por Chicón *et al.*¹⁰⁵ y Valderas⁸⁴, en mosto para el ácido glutámico fueron (1,50-195 mg/L) y (26,2-125 mg/L), glutamina (3,00-400 mg/L) y (33,6-179 mg/L), alanina (0,60-102 mg/L) y (33,7-161 mg/L), arginina (0,30-38,6 mg/L) y (32,2-95,2 mg/L) respectivamente.

Por otro lado, Valderas⁸⁴ encontró en vino concentraciones entre (18,7-44,5 mg/L) de ácido glutámico, (4,69-44,1 mg/L) de glutamina, (12,7-62,6 mg/L) de alanina y (7,80-23,1 mg/L) de arginina.

Solo para dos aminoácidos (glutamina y alanina) los resultados tanto en mosto como en vino, estuvieron acordes a los presentados por Valderas⁸⁴ y Chicón *et al.*¹⁰⁵. Para el caso del ácido glutámico y la arginina, sus concentraciones estuvieron altas con respecto a estos estudios^{84,105}.

La determinación de aminoácidos es especialmente relevante desde el punto de vista de la cantidad de nitrógeno que necesita la levadura para llevarse a cabo la fermentación. Los aminoácidos tienen diferentes evoluciones durante la fermentación alcohólica, el ácido glutámico y alanina tienen una fase de disminución en las etapas iniciales y un aumento hacia el final de la fermentación, este hecho se asocia a la autólisis celular, ver *Figuras 28 y 29*.

La autólisis de las levaduras se podría definir como la hidrólisis de biopolímeros bajo la acción de enzimas hidrolíticas que libera compuestos citoplasmáticos (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) y de la pared celular (glucanos y manoproteínas)¹⁰⁶.

La arginina es uno de los aminoácidos que son considerados como de “buena fuente” de nitrógeno para las levaduras y son consumidos casi por completo en las primeras etapas de la fermentación. El perfil encontrado en este estudio para la alanina (ver *Figura 30*), coincide con estudios previos con resultados similares^{107,108}, así mismo, para la glutamina como se comentó en el *Capítulo 1*, es un aminoácido rápidamente absorbido, este se consume hasta el final de la fermentación, ver perfil en la *Figura 31*.

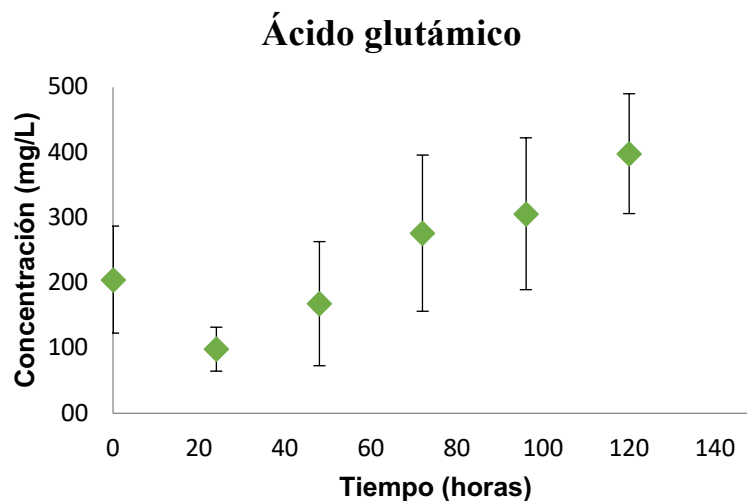


Figura 29: Perfil de concentración (mg/L) del ácido glutámico en ocho fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère*.

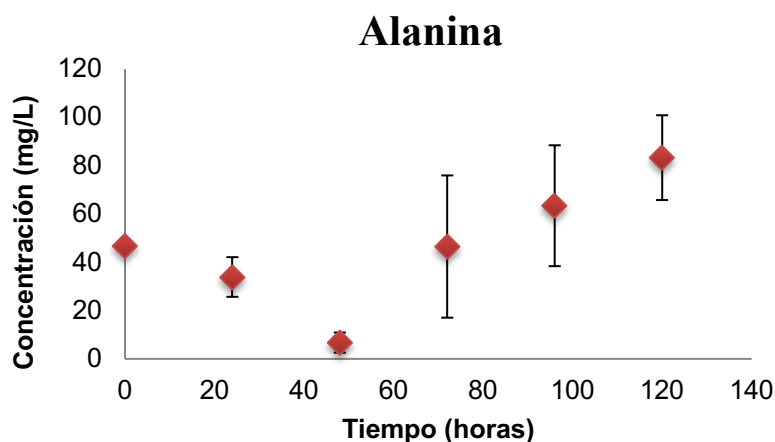


Figura 30: Perfil de concentración (mg/L) de alanina en ocho fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère*.

No se pudo cuantificar la L-prolina debido a la determinación de algunas cifras de mérito que no cumplieron los criterios de aceptación. Otros autores cuantificaron la prolina que es el aminoácido más abundante en el mosto y en el vino, los altos contenidos al inicio de la fermentación se deben a la dificultad con la que las levaduras metabolizan este aminoácido durante la fermentación alcohólica, por lo que las cantidades de prolina en los vinos son similares a la de los correspondientes mostos¹⁰⁹.

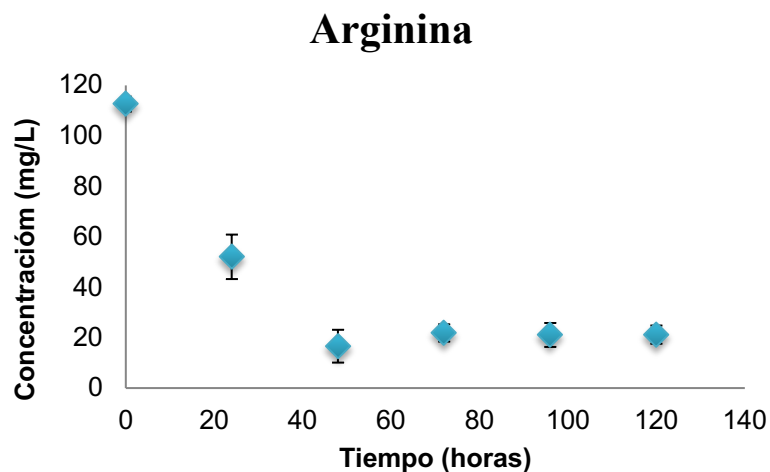


Figura 31: Perfil de concentración (mg/L) de arginina en ocho fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère*.

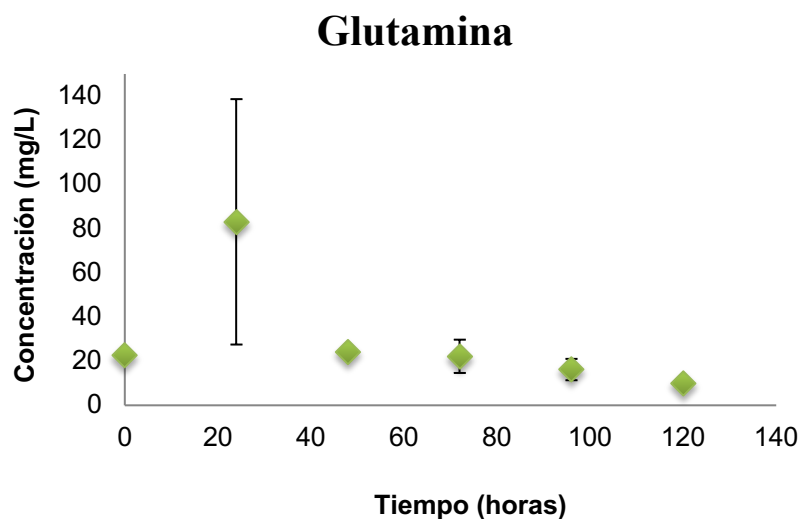


Figura 32: Perfil de concentración (mg/L) de glutamina en ocho fermentaciones alcohólicas del vino *Carménère*.

Por otro lado, paralelamente a la cuantificación de los aminoácidos por HPLC-UV, también se determinaron por RMN, de esta manera se pudo obtener los datos por el método de referencia y por el método propuesto respectivamente. Posteriormente, la predicción de los aminoácidos aplicando el método PLS como se propone en el objetivo final de esta tesis doctoral.

4.2.3 Determinación de aminoácidos por RMN

Cuando se obtiene un espectro de muestras complejas como es la de un mosto en fermentación o vino, éste presenta una gran cantidad de señales correspondientes a todas las sustancias que conforman esta matriz. Si los analitos de interés están en muy baja concentración e interfieren las señales intensas del disolvente, es adecuado usar la técnica de supresión de disolvente (como, por ejemplo: saturación/presaturación o supresión por gradiente de campo magnético) para minimizar o eliminar estas señales, y mejorar la relación señal ruido (S/N). La técnica simple de supresión de disolvente es presaturación de la frecuencia del solvente antes del pulso fuerte de 90 grados¹¹⁰. La supresión de la señal consiste en enviar un pulso de radio frecuencia a la frecuencia de resonancia específica del solvente (agua), que satura y reduce al máximo su señal.

Como los aminoácidos se encontraron en una concentración muy baja en las muestras de mostos en fermentación, se recurrió a experimentos como supresión de disolvente (saturación/presaturación) para obtener una mayor intensidad en las señales de las muestras. La asignación del desplazamiento químico es dificultosa porque las señales intensas del agua, etanol y glicerol traslapan las señales débiles.

La mejora en la intensidad se corroboró comparando los espectros de protón sin supresión de disolvente y con supresión de disolvente, ambos espectros con estándar de desplazamiento químico TSP (2,2,3,3-d4-(trimetilsilil)propanoico) para calibrar la frecuencia de absorción de la señal, ver *Figuras 32 y 33*.

Para la identificación de los aminoácidos de interés (L-Prolina, L-Arginina, L-Alanina, L-Glutamina y ácido L-Glutámico) se tomaron individualmente los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN de cada estándar, ver *Anexos 2 y 3*. Estos espectros se tomaron de dos formas: Con ajuste de pH a 3,45 (NaOH 0,01 N o HCl 0,01 N) y, sin ajuste de pH, debido a que el pH puede influenciar considerablemente el desplazamiento químico³⁰. Se compararon los espectros con y sin ajuste de pH y se consideró que no hubo diferencias en su desplazamiento químico (δ , ppm).

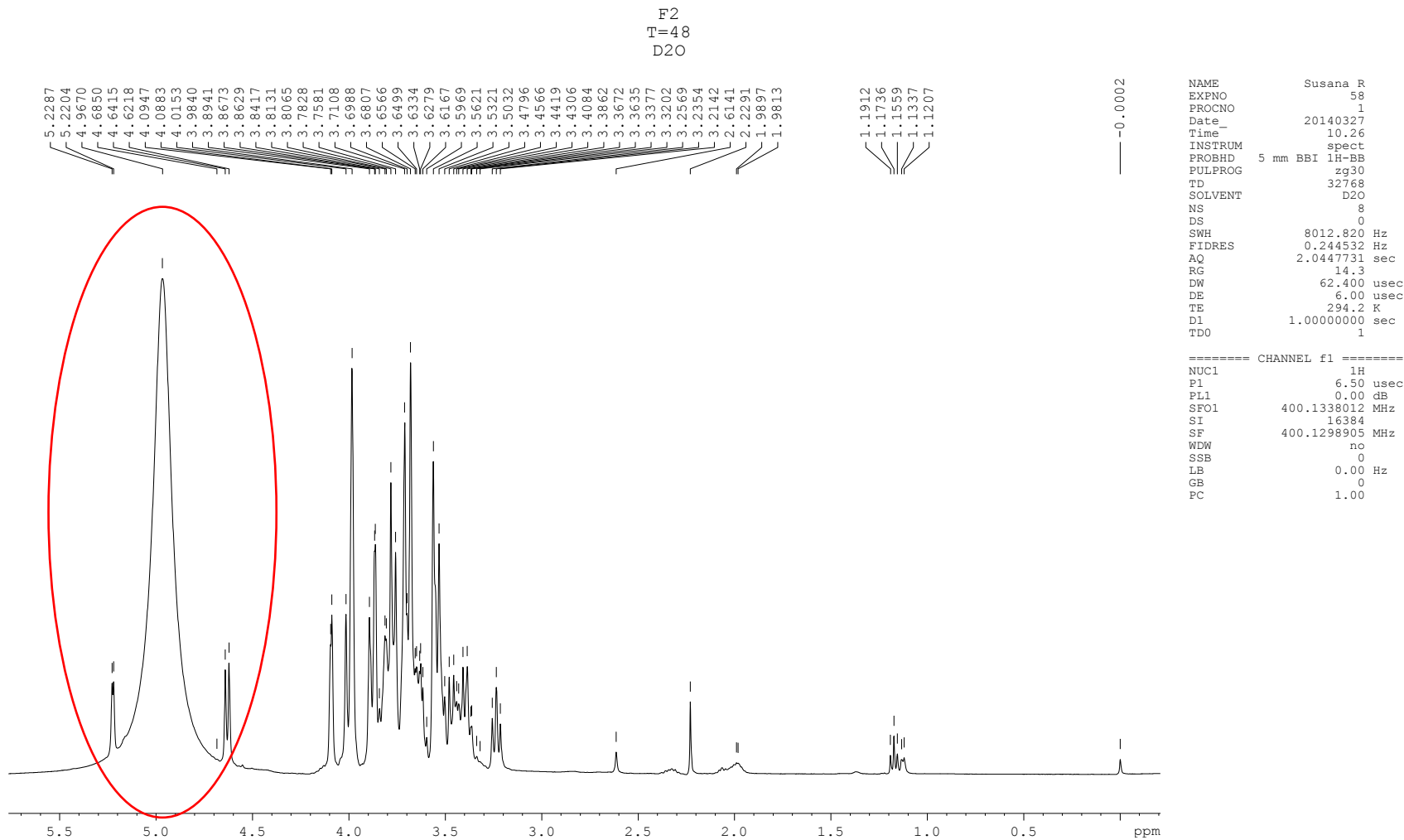


Figura 33: Espectros de ¹H RMN sin supresión de disolvente, sin filtrar y con TSP.

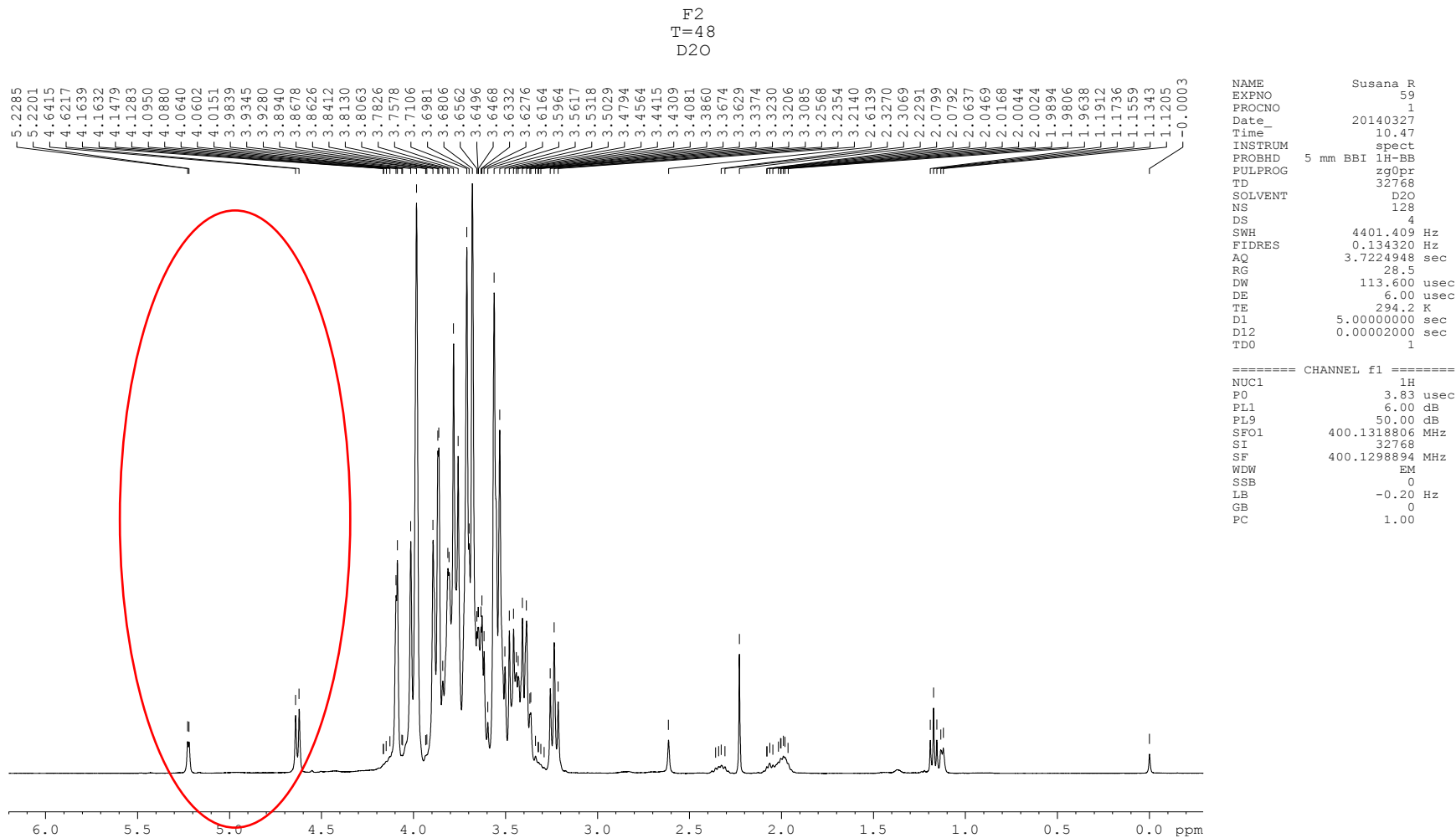


Figura 34: Espectros de ¹H RMN con supresión de disolvente, filtrada y con TSP.

En el *Anexo 4*, se muestra la continuación de todos los experimentos de protón con y sin supresión de disolvente para las fermentaciones F1, F2, F5 a t=0, 48, 98 horas. Los espectros de protón con supresión de disolvente son los que se utilizan para el trabajo quimiométrico en la plataforma MVC1 de Matlab (versión 2012a). En el mismo anexo se presentan los experimentos de ^{13}C RMN para las fermentaciones F1, F2, F5 a t=0, 48, 98 horas.

Del análisis espectral se pudo obtener los datos espectroscópicos para cada aminoácido, un resumen de los resultados se puede ver en la *Tabla 29*. Los desplazamientos de protón de los aminoácidos en mosto o vino se encuentran entre la región 1,5-4,0 ppm aproximadamente.

Tabla 29: Datos espectroscópicos de ^1H RMN²⁷.

Compuesto	^1H RMN	$\delta(\text{ppm})$	Multiplicidad	J(Hz)	Asignación
Prolina	H1	4,13	t	8,30	CH
	H2	2,35	m	-	CH ₂
	H3	2,03	m	-	CH ₂
	H4	3,38	m	-	CH ₂
Arginina	H1	3,27	t	6,03	CH
	H2	1,65	m	-	CH ₂
	H3	1,60	m	-	CH ₂
	H4	3,20	m	-	CH ₂
Alanina	H1	3,78	q	-	CH ₃
	H2	1,48	d	7,97	CH
Glutamina	H1	3,78	t	6,78	CH
	H2	2,45	m	-	CH ₂
	H3	2,14	m	-	CH ₂
Ácido glutámico	H1	3,78	t	6,89	CH
	H2	2,50	m	-	CH ₂
	H3	2,12	m	-	CH ₂

Los espectros de ^1H RMN de cada aminoácido se superpusieron con los espectros de ^1H RMN de las muestras en estudio (F1, F5). Posteriormente, se buscaron señales en el mosto que coincidieran con las señales de cada estándar de aminoácido (ver líneas verticales discontinuas), como se muestra en las *Figuras 34, 35*.

En la *Figura 34*, se superpusieron los espectros calibrados con la señal del TSP del ácido glutámico, glutamina, prolina, alanina y arginina con una muestra de la fermentación cinco (F5) a $t=0$ h, observándose que algunas señales de los aminoácidos si coincidían con las señales de las muestras.

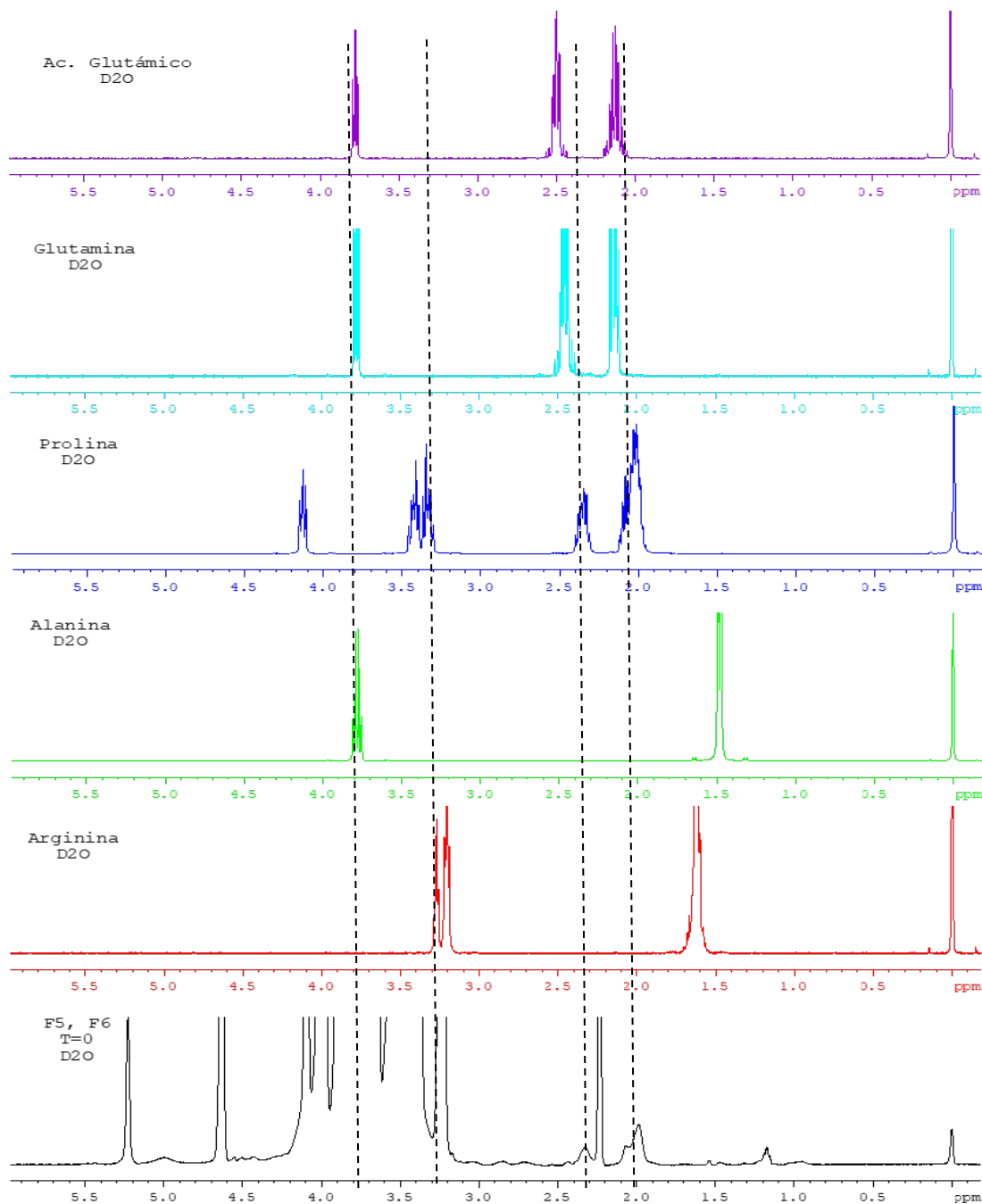


Figura 35: Espectros de ^1H RMN de aminoácidos en D_2O superpuestos con una muestra (F5) de la fermentación alcohólica del vino a $t=0$ h.

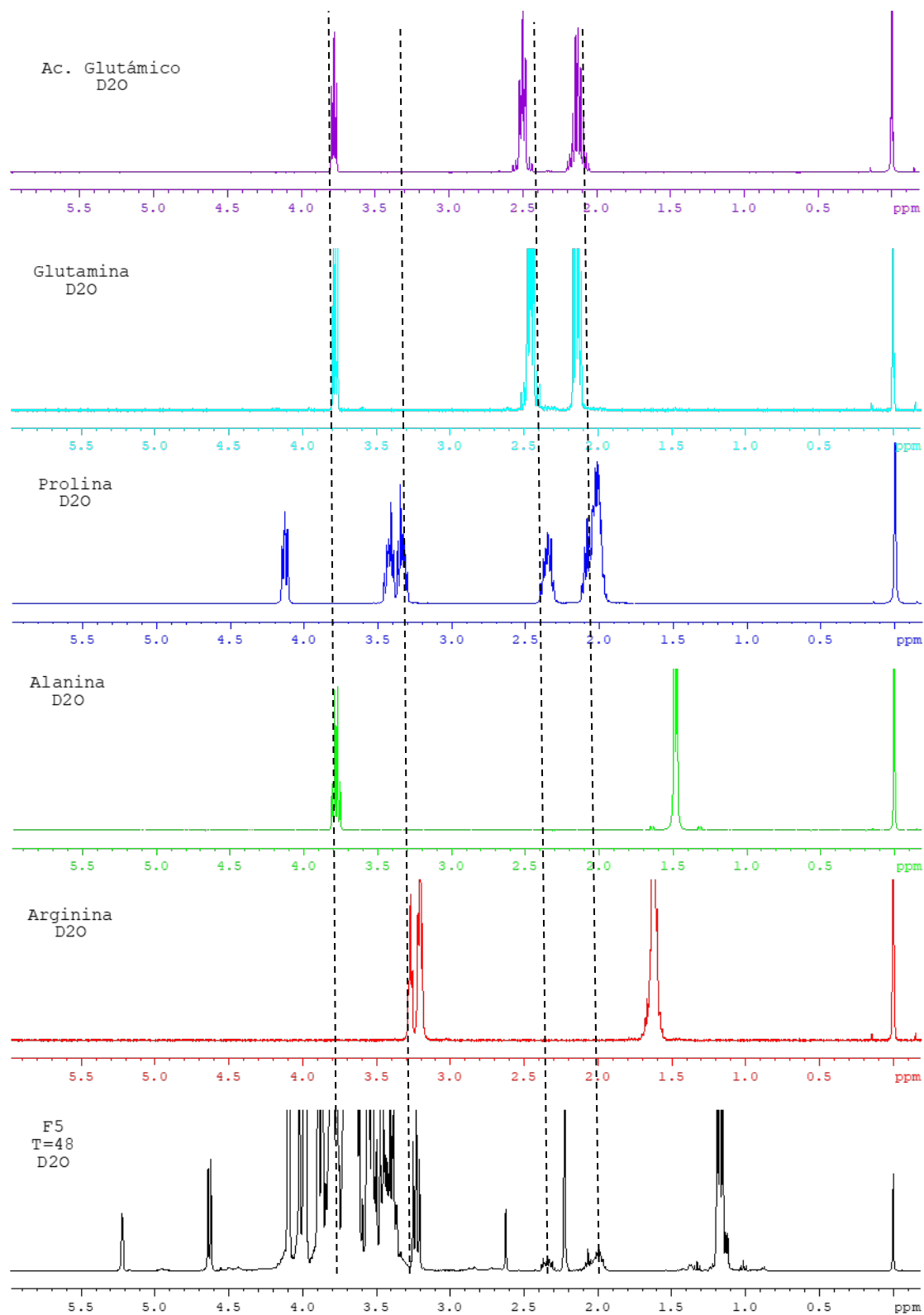


Figura 36: Espectros de ^1H RMN de aminoácidos en D_2O superpuestos con una muestra (F5) de la fermentación alcohólica del vino a $t=48$ h.

A las señales encontradas en las muestras que coincidían con los aminoácidos, se les aplicó un experimento de pulso selectivo TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) para verificar si correspondía al aminoácido buscado.

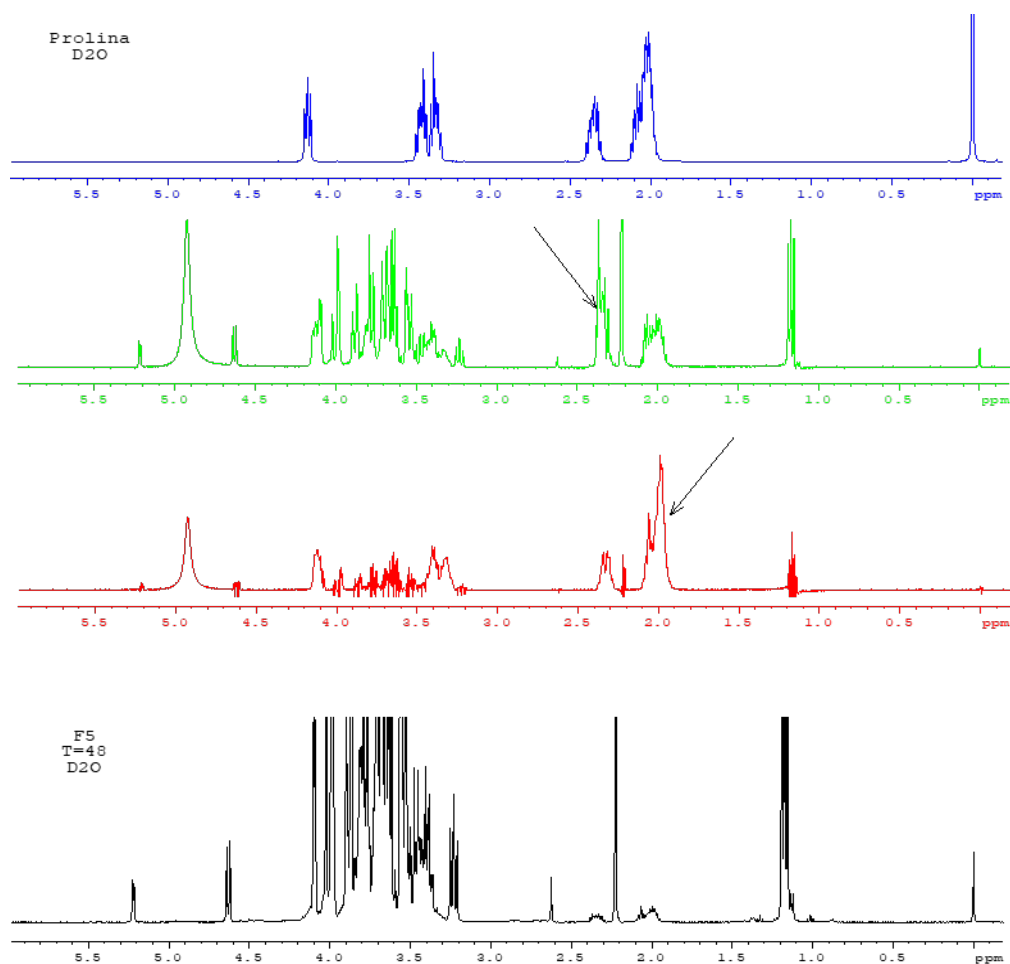


Figura 37: Espectro de ^1H RMN del estándar de prolina en D_2O con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 t=48 h.

En *Figura 36*, se irradió una señal selectivamente en la muestra, y para este caso se quiso comprobar si se trataba de prolina, efectivamente si, debido a que la señal irradiada se acopló entre los subsistema de espín, a través de ^3J principalmente.

Finalmente, las señales acopladas se superpusieron con las señales del estándar prolina y se pudo confirmar que era dicho aminoácido.

Este mismo procedimiento se realizó para cada muestra con los diferentes aminoácidos.

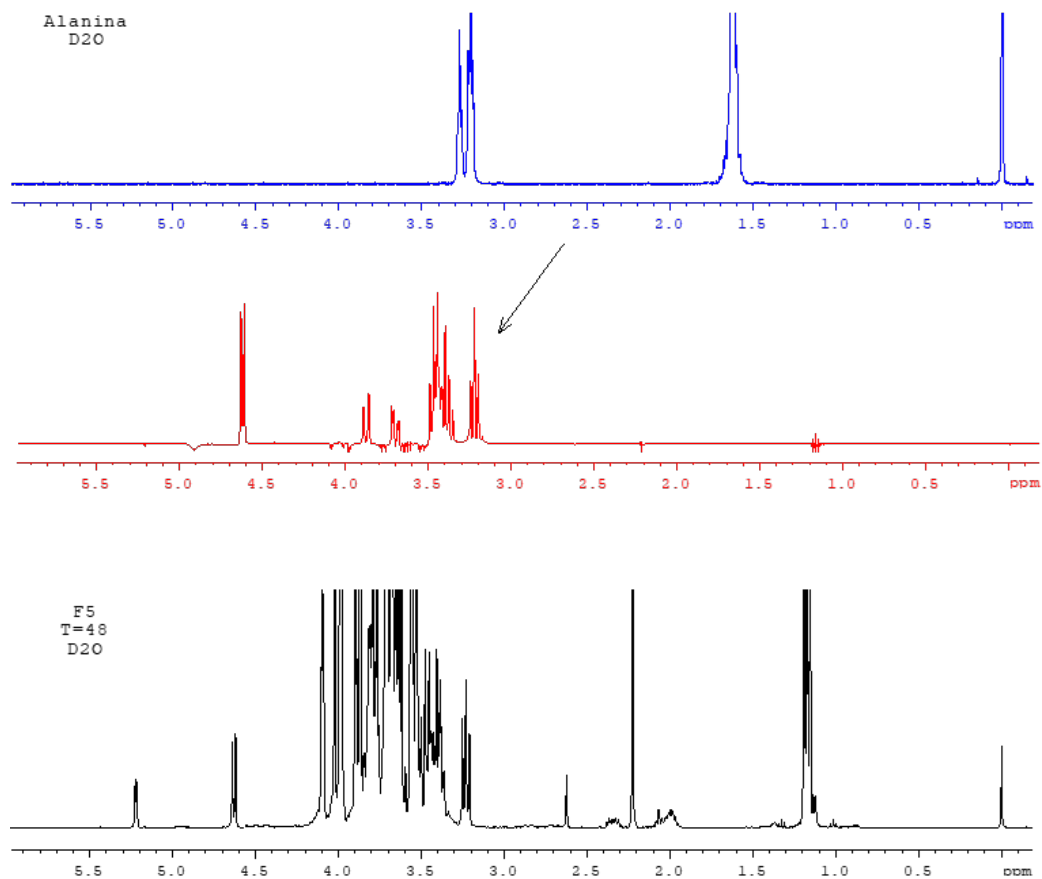


Figura 38: Espectro de ^1H RMN del estándar de alanina en D_2O con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 $t=48$ h.

Similarmente, en la *Figura 37* se quiso verificar si en la muestra contenía alanina. Por consiguiente, se aplicó TOCSY y se observó que las señales que se correlacionaron con el subsistema de espín, ninguna coincidía con las señales del espectro de alanina, de modo que, la muestra a $t=48$ h de la F5 no contiene este aminoácido.

En el *Anexo 5*, se presentan más experimentos para la fermentación uno (F1) a $t=0$, 48 y 96 horas, las señales de prolina y arginina coincidieron con las señales de las muestras, sin embargo, se realizó TOCSY para confirmar la presencia de estos aminoácidos y se concluyó que no se encuentran en esas muestras.

Finalmente, se realizó el mismo procedimiento para los espectros de las *Figuras 38* y *39*, se comprobó al aplicar TOCSY que las señales no coincidían con las del estándar, por consiguiente, la muestra no contiene alanina.

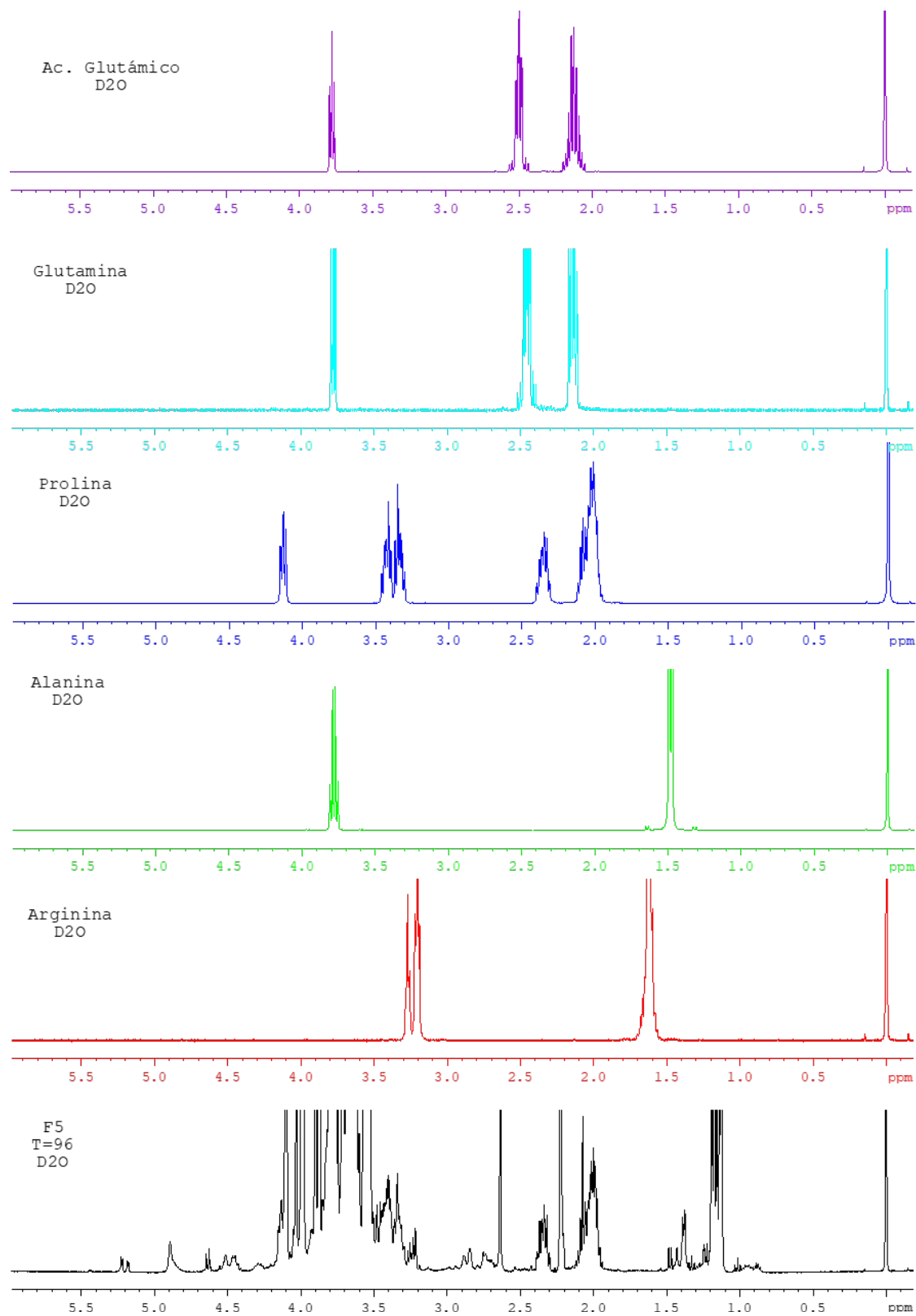


Figura 39: Espectros de ^1H RMN de aminoácidos en D_2O superpuestos con una muestra (F5) de la fermentación alcohólica del vino a $t=96$ h.

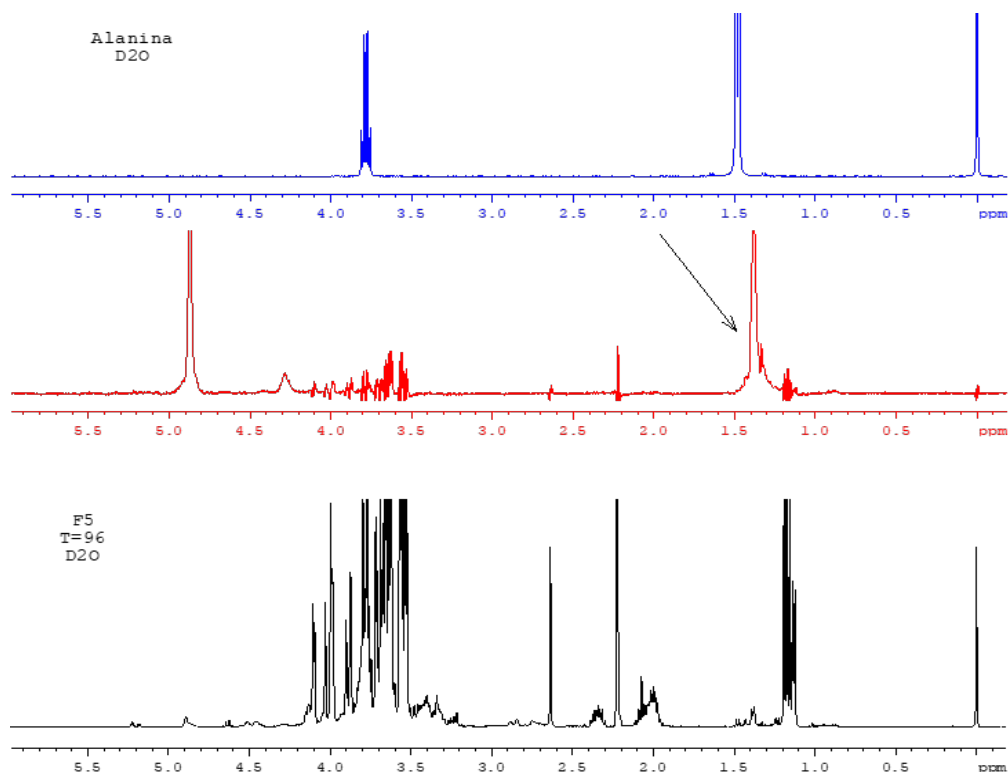


Figura 40: Espectro de ^1H RMN alanina con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 $t=96$ h.

De manera similar, se realizó el experimento en la muestra (F5, $t=96$ h) para confirmar si había presencia de prolina. Para este caso, se concluyó que esta muestra si contiene prolina, ver *Figura 40*.

Referente a las dos técnicas presentadas (HPLC y RMN) para la determinación de aminoácidos, es importante mencionar que cada una tiene sus ventajas e inconvenientes. El criterio predominante que influye en la selección es el tiempo y costo de análisis como también son la resolución, la sensibilidad y límites de detección.

Con respecto al HPLC, este ofrece una alta precisión, pero el tiempo de análisis es largo comparado con RMN, ya que éste conlleva un tratamiento de muestra que involucra derivatización de los aminoácidos, alto costo en solventes, estándares y reactivos, además, los derivados que se obtienen son inestables¹⁰⁹.

Por otro lado, una de las sobresalientes ventajas que ofrece la RMN en el campo del análisis químico en productos alimenticios es que no es destructiva, es selectiva y es capaz

de detectar simultáneamente un gran número de moléculas y análisis directo de la muestra en un simple experimento^{54,55}. Esta técnica requiere un tratamiento simple de muestra (liofilización) y el tiempo de análisis es relativamente corto en comparación con HPLC³⁰, y mínima cantidad de muestra. Sin embargo, el mayor inconveniente es el costo.

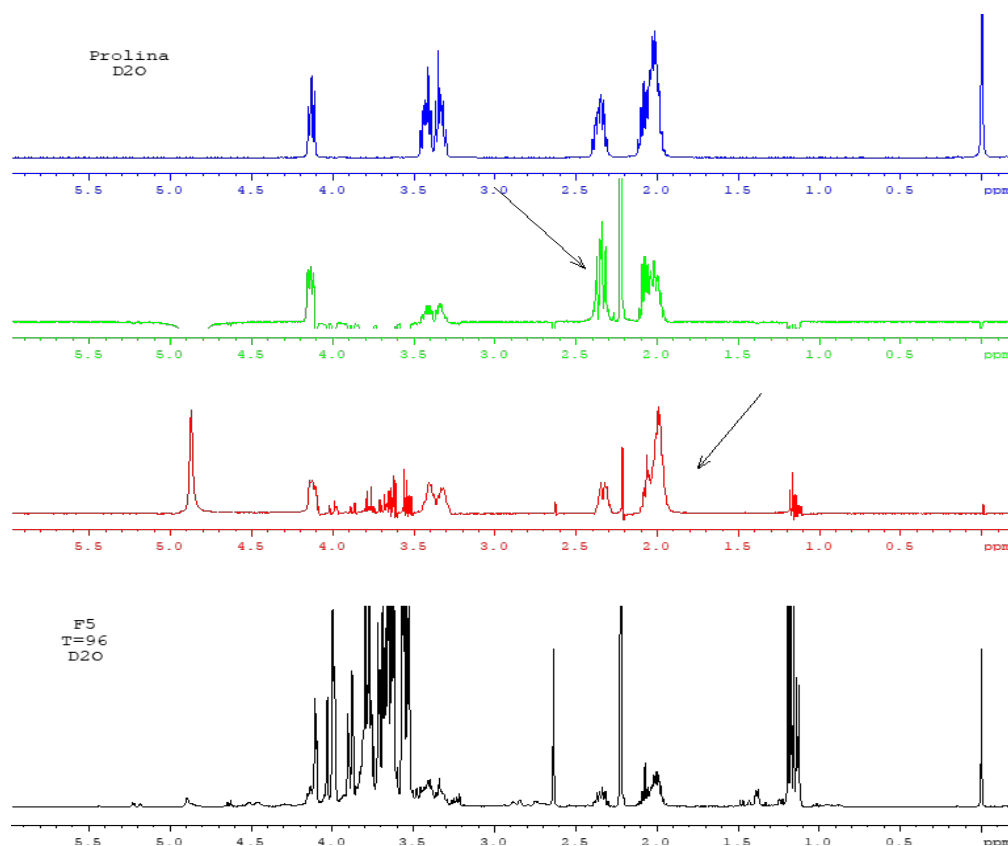


Figura 41: Espectro de ¹H RMN del estándar prolina en D₂O con experimento de pulso selectivo TOCSY, F5 t=96 h.

4.3 Calibración, validación y predicción

Esta sección presenta los principales resultados de los modelos de calibración y validación que se obtuvieron a partir de las espectroscopias IR-TF y RMN en combinación con el método quimiométrico PLS, enfocado en el desarrollo de los objetivos específicos 3 y 6 de esta tesis.

4.3.1 Ácidos grasos

Teniendo en cuenta la gran variabilidad en los resultados (discutida anteriormente) de la cuantificación de los ácidos grasos en mostos de fermentaciones normales y problemáticas, se quiso explorar la herramienta quimiométrica PLS, esperando claramente resultados con errores muy altos.

4.3.1.1 Autopredicción en mosto sintético seco

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al aplicar los diferentes métodos de preprocesamiento^{39,47,51,53} a los espectros obtenidos de mosto sintético seco por IR-TF (ver *Tabla 30*). Se realizó una autopredicción (las muestras para la calibración son las mismas para la validación) con PLS para cada uno de los analitos, utilizando como valores de referencia las concentraciones conocidas del mosto sintético.

La autopredicción se realizó para observar el comportamiento del universo de muestras.

Tabla 30: Autopredicción del mosto sintético seco por IR-TF.

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Región espectral (cm ⁻¹)
C ₆	1ª derivada	4	0,380	6,572	0,988	2300-2618
C ₈	Centrado	4	0,120	2,567	0,999	2619-3255
C ₁₀	Centrado	4	0,321	2,862	0,998	2725-3255
C ₁₂	1ª derivada	3	0,779	9,955	0,980	2619-2830
C _{14:1}	Centrado	3	0,035	9,648	0,910	1557-2087
C _{16:1}	1ª derivada	4	0,325	7,153	0,982	2787-2892
C _{18:1}	Centrado	4	0,254	3,589	0,997	2451-3000
C _{18:2}	Centrado	5	0,444	2,207	0,999	1769-2583
C _{18:3}	Centrado	4	0,095	2,798	0,998	2831-3255

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

Como se mencionó en el *Capítulo 1*, los datos espectrales pueden aparecer contribuciones no deseadas (debido al proceso de registro, a la naturaleza de la muestra, al ruido

instrumental, entre otros) que causan no linealidades u otros efectos que pueden afectar negativamente el modelo de calibración a construir. Es por esta razón, que se exploraron varios tipos de preprocesamiento espectral, encontrando que los más predominantes son primera derivada y centrado para el caso de los espectros de mosto sintético seco.

En relación a los resultados presentados en la *Tabla 30*, se utilizó un conjunto de muestras (12 soluciones) de mosto sintético seco para la autopredicción, obteniendo para cada analito errores de predicción (RMSEP) que no sobrepasaron el 10%^{35,53} y un R^2 muy cercano a 1 ($>0,99$) como criterios de aceptación, estos parámetros indican que la calidad predictiva de los modelos cumple satisfactoriamente lo esperado para cuantificar/predecir los analitos de interés en el rango espectral hallado.

4.3.1.2 Autopredicción en mosto sintético húmedo

En la *Tabla 31*, se presentan los resultados obtenidos de la autopredicción con PLS para cada uno de los analitos, utilizando como valores de referencia las concentraciones conocidas del mosto sintético.

Tabla 31: Autopredicción del mosto sintético húmedo por IR-TF.

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Región espectral (cm ⁻¹)
C ₆	Centrado	3	0,682	11,796	0,963	1557-3255
C ₈	1ª derivada	3	0,261	6,252	0,992	2194-2406
C ₁₀	1ª derivada	6	0,426	4,181	0,995	1769-2406
C ₁₂	Centrado	6	0,430	6,071	0,993	1019-389
C _{14:1}	1ª derivada	6	0,000	0,078	1,000	2406-2724
C _{16:1}	Centrado	4	0,076	1,972	0,999	2619-2830
C _{18:1}	1ª derivada	6	0,228	3,228	0,997	2844-3255
C _{18:2}	1ª derivada	6	0,772	4,141	0,996	1876-2937
C _{18:3}	1ª derivada y centrado	6	0,123	3,618	0,997	2088-3680

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

Comparando los resultados de la autopredicción para el mosto sintético seco y húmedo, estos arrojaron valores muy similares. Para todos los analitos en el mosto sintético húmedo los RMSEP estuvieron por debajo del 12% y el R^2 cercano a 1 (ver *Tabla 31*).

Los modelos de predicción con PLS de las *Tablas 30 y 31*, tienen una excelente capacidad predictiva, esto es debido posiblemente porque el modelo responde adecuadamente frente a interferencias conocidas como las que presenta el mosto sintético preparado, para ambos casos cumplen con los criterios de aceptación.

En la *Figura 40*, se realiza una comparación de los espectros de muestras en su forma seca y húmeda como se describió anteriormente.

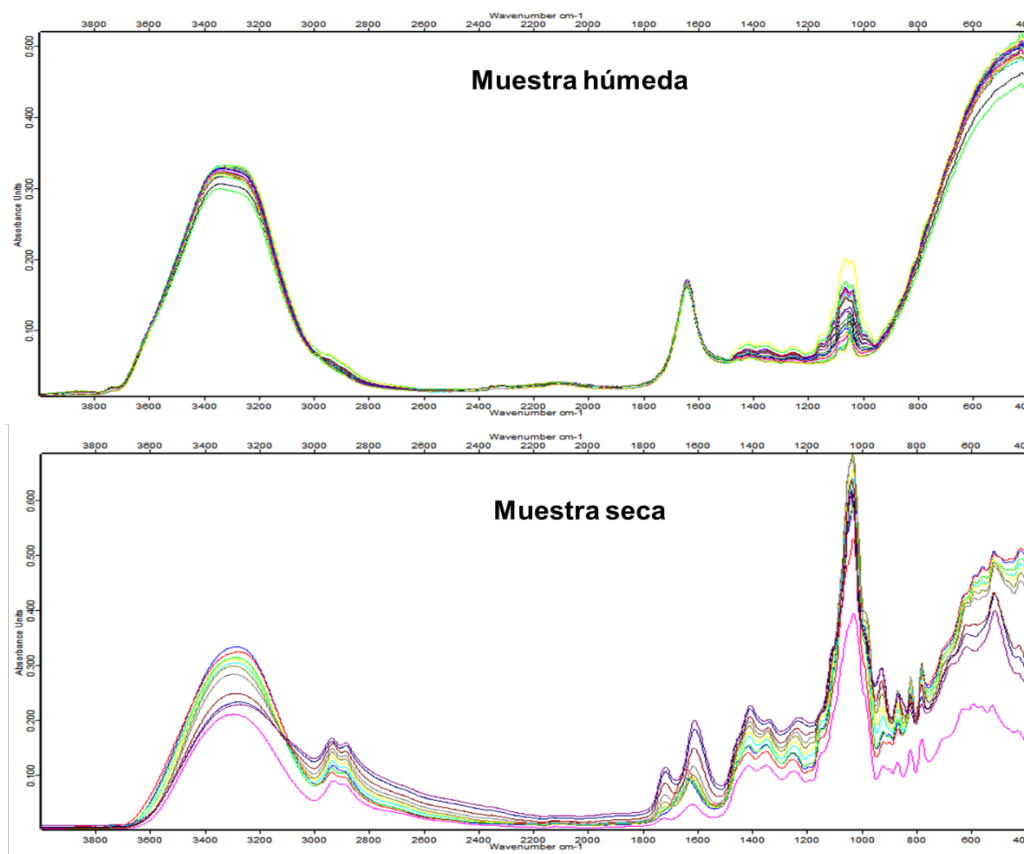


Figura 42: Comparación de espectros de muestra seca y muestra húmeda.

Claramente en la muestra húmeda se observa una banda ancha entre $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ asociada a enlaces O-H del agua e interacciones intermoleculares (puentes de hidrógeno), esta banda ancha son un gran interferente ya que podría solapar alguna otra que pudiera entregar una información relevante, sin embargo, ninguna de las bandas asociadas a los

ácidos grasos coinciden en ese rango. Adicionalmente, la gran diferencia espectral se observa en la escala de absorbancia, debido a que las bandas aparecen más intensas en la muestra seca que húmeda, pese a esto, los resultados de las *Tablas 30 y 31* fueron muy similares, indicando que la información espectral entregada es indiferente de la toma del espectro en muestra seco o húmeda.

4.3.1.3 Calibración y validación en mosto real seco (Fermentaciones normales).

Teniendo en cuenta que los resultados de la cuantificación de los ácidos grasos arrojaron una incertidumbre muy grande y que al construir un modelo con estas muestras no es viable para poder predecir concentraciones, aun así, se quiso probar modelos de calibración y validación con las fermentaciones reales del vino *Carménère* (solo de fermentaciones normales) sin considerar el mosto sintético. Los espectros en el IR-TF también se tomaron de forma seca y húmeda, los resultados se presentan en las *Tablas 32 y 33*.

Tanto para el mosto real seco y húmedo se seleccionó para construir la matriz de calibración (X_{cal}) el 75% de las muestras (36 muestras) y el 25% para la validación (X_{val}) (12 muestras)⁵³.

Tabla 32: Mosto real seco (Fermentaciones normales), Cal[75%] y Val[25%].

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Región espectral (cm ⁻¹)
C ₆	Centrado y MSC	4	0,951	55,937	0,044	740-2416
C ₈	Centrado y 1ª derivada	6	1,606	62,848	0,200	
C ₁₀	1ª derivada	3	0,692	38,829	0,209	
C ₁₂	1ª derivada	6	0,416	98,078	0,267	1113-1391
C _{14:1}	Centrado	6	0,070	143,950	0,184	2045-2323
C _{16:1}	Centrado	5	0,566	39,436	-11,031	1486-2602
C_{18:1}	1ª derivada	6	0,419	34,852	-0,373	1206-3628
C _{18:2}	Centrado	6	2,918	109,030	-4,783	
C _{18:3}	Centrado	5	0,531	44,451	-0,463	2045-2602

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

De la *Tabla 32*, los errores de predicción estuvieron entre 34-144% y un R^2 muy alejado de 1, esto indica que ningún modelo presenta una buena calidad predictiva (resultado esperado), esto posiblemente puede deberse a que el PLS no funciona adecuadamente frente a interferencias desconocidas o no simuladas, esto es de las grandes desventajas del método, a parte de la razón fundamental que es que las concentraciones de ácidos grasos tienen una variabilidad muy alta.

Para este caso, el mosto real es una matriz muy compleja que presenta una gran cantidad de interferencias que no se simularon en el modelo.

En la bibliografía se han aceptado para muestras valores de predicción hasta el 35% para muestras complejas.

4.3.1.4 Calibración y validación en mosto real húmedo (Fermentaciones normales).

Tabla 33: Mosto real húmedo (Fermentaciones normales), Cal[75%] y Val[25%].

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Región espectral (cm ⁻¹)
C _{6:0}	Centrado y 1 ^a derivada	3	0,863	53,833	0,169	3715-3996
C _{8:0}	1 ^a derivada	3	1,995	78,438	-0,235	
C_{10:0}	Centrado y 1^a derivada	3	0,464	26,058	0,527	742-881
C _{12:0}	Centrado y MSC	5	0,516	78,381	-0,080	
C _{14:1}	MSC	6	0,139	287,390	-0,513	
C_{16:1}	MSC	4	0,130	10,523	0,243	742-3005
C_{18:1}	Centrado y 1^a derivada	3	0,360	29,891	-0,010	600-1306
C _{18:2}	Centrado	5	3,294	123,070	-6,368	
C _{18:3}	MSC	3	1,779	113,410	-15,407	

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

De la *Tabla 33*, se pueden observar los errores de predicción que se encuentran entre 10-288%. Para los analitos C₁₀, C_{16:1} y C_{18:1} tuvieron RMSEP de 26,0; 10,5 y 29,9%

respectivamente, siendo estos valores aceptables (<35%) para un modelo de calibración y validación, sin embargo, el R^2 sigue estando muy alejado de 1 (criterio de aceptación >0,990), por lo tanto, el modelo no cumple con todos los parámetros para que tenga una buena capacidad predictiva como ya se esperaba.

Una de las posibles soluciones que se proponen para mejorar los modelos de calibración y validación es:

-Obtener resultados del método de referencia con una baja variabilidad, para el caso de las muestras de mosto en fermentación (normales y problemáticas), se propone no congelar las muestras y poder determinar las concentraciones en el menor tiempo posible después de la toma de muestra.

4.3.1.5 Otras estrategias evaluadas

- ☑ Para la calibración se utilizaron muestras de mosto sintético seco, para la validación y predicción se usaron muestras de mosto real seco provenientes solo de fermentaciones normales.
- ☑ Se realizó autopredicción con mosto sintético húmedo y mosto real húmedo, muestras provenientes de fermentaciones normales y problemáticas.
- ☑ Para la calibración [75%] se utilizaron muestras de mosto sintético húmedo y mosto real húmedo (Fermentaciones normales), y para la validación [25%] se usaron muestras de mosto real húmedo (Fermentaciones problemáticas).

En la *Tabla 34*, se muestran los resultados de los RMSEP entre (17-70%). Se escogieron para estas calibraciones el mosto sintético (12 muestras) y para las validaciones el mosto real seco (12 muestras de fermentaciones normales). Para los analitos $C_{8:0}$, $C_{10:0}$, $C_{12:0}$,

C_{14:1}, C_{18:1} y C_{18:2}, tuvieron RMSEP aceptables, sin embargo, el R² arrojado no tuvo un valor adecuado para ninguno de los modelos.

Cabe destacar, que los modelos de calibración y validación mostrados en la *Tabla 34*, fueron los mejores resultados obtenidos hasta el momento con muestras reales a pesar de la gran variabilidad de los datos de referencia. Considerando lo expuesto, se realizaron predicciones con los modelos de la *Tabla 34*, se utilizaron 12 muestras secas de fermentaciones normales.

Tabla 34: Mosto sintético seco [Cal] y Mosto real seco (fermentaciones normales) [Val y Pred].

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Región espectral (cm ⁻¹)
C _{6:0}	1ª derivada y MSC	2	2,30	44,1	-1,14	
C _{8:0}	1ª derivada y MSC	4	1,31	31,4	0,28	
C _{10:0}	SNV	4	2,83	27,7	-0,52	
C _{12:0}	SNV y MSC	3	2,64	31,1	-1,54	
C _{14:1}	Centrado	3	0,10	28,5	-2,43	1760-2037
C _{16:1}	Centrado y SNV	3	1,71	37,7	-0,77	
C _{18:1}	Centrado y SNV	6	1,23	17,4	-1,55	
C _{18:2}	Centrado y SNV	6	6,67	33,2	-0,57	
C _{18:3}	Centrado y SNV	6	2,37	69,7	-0,02	

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

Los resultados de las predicciones de los ácidos saturados e insaturados se muestran en las *Tablas 35* y *36*. Las concentraciones (mg/L) predichas por PLS se compararon con las concentraciones obtenidas por GC-FID y se calculó el porcentaje de diferencia relativa (%RD). Este %RD debe ser <17%⁵¹.

Se esperaba que estos errores fueran altos debido a que el modelo obtenido no cumplía con los parámetros como se mencionó anteriormente para que un modelo sea adecuado.

Tabla 35: Predicciones de ácidos grasos saturados en muestras reales secas (Fermentaciones normales).

Analito	N° Muestras	Concentraciones mg/L			Analito	N° Muestras	Concentraciones mg/L		
		IR-TF	GC-FID	%RD ⁵¹			IR-TF	GC-FID	%RD*
C _{6:0}	1	0,257	-1,182	559,9	C _{8:0}	1	0,071	-0,392	559,2
	2	0,991	-1,140	215,0		2	1,056	-0,246	128,9
	3	3,897	-0,463	111,9		3	3,411	1,719	290,7
	4	3,732	1,769	52,6		4	3,334	2,592	255,7
	5	3,095	4,042	30,6		5	2,630	4,712	83,8
	6	4,301	5,975	38,9		6	3,775	4,038	270,5
	7	0,257	-1,509	687,2		7	0,071	-0,184	266,3
	8	1,054	-0,629	159,7		8	0,984	0,063	92,0
	9	2,646	1,336	49,5		9	2,708	2,471	179,6
	10	1,984	3,577	80,3		10	1,838	4,784	76,5
	11	1,791	5,589	212,1		11	1,369	4,502	192,0
	12	1,838	6,297	242,6		12	1,346	3,734	142,8
C _{10:0}	1	0,500	0,826	65,2	C _{12:0}	1	0,189	1,113	570,0
	2	0,886	0,946	6,8		2	0,365	1,045	249,8
	3	1,568	1,142	27,2		3	0,398	1,738	396,9
	4	1,875	1,259	32,9		4	0,359	3,443	923,2
	5	1,686	2,696	59,9		5	0,324	6,605	2006,2
	6	2,121	5,732	170,2		6	0,361	Excluida	---
	7	0,500	0,997	99,4		7	0,189	-0,948	520,5
	8	1,069	0,844	21,0		8	0,244	1,026	396,1
	9	1,540	1,150	25,3		9	0,835	2,589	226,6
	10	1,184	2,254	90,4		10	0,186	5,981	3197,0
	11	0,866	5,262	507,6		11	0,529	10,380	1909,3
	12	0,872	6,733	672,1		12	0,166	Excluida	---

*%RD, porcentaje de diferencia relativa= ((Método FTIR-Método de Referencia) *100/Método de Referencia).

Posteriormente, se robustece el modelo con las muestras de mosto sintético húmedo y mosto real húmedo que incluye fermentaciones normales y problemáticas. Primero se realiza una autopredicción para observar el comportamiento de este universo de muestras, los resultados se muestran en la *Tabla 37*.

Tabla 36: Predicciones de ácidos grasos insaturados en muestras reales secas (Fermentaciones normales).

Analito	N° Muestras	Concentraciones mg/L			Analito	N° Muestras	Concentraciones mg/L		
		IR-TF	GC-FID	%RD*			IR-TF	GC-FID	%RD
C _{14:1}	1	0,025	0,084	236,0	C _{16:1}	1	0,274	0,081	70,4
	2	0,073	0,067	8,2		2	0,000	0,051	---
	3	0,074	0,027	63,5		3	4,171	0,447	89,3
	4	0,058	-0,157	370,7		4	3,853	1,444	62,5
	5	0,039	-0,425	1189,7		5	2,914	3,039	4,3
	6	0,141	Excluida	---		6	2,622	5,288	101,7
	7	0,025	0,080	220,0		7	0,274	0,029	89,4
	8	0,000	0,066	---		8	0,121	0,178	47,1
	9	0,376	-0,076	120,2		9	5,136	1,149	77,6
	10	0,072	-0,393	645,8		10	3,396	2,760	18,7
	11	0,000	-0,704	---		11	2,807	4,826	71,9
	12	0,000	Excluida			12	2,891	5,146	78,0
C _{18:1}	1	1,280	-0,255	119,9	C _{18:2}	1	14,613	11,565	20,9
	2	2,309	-0,151	106,5		2	0,000	12,266	---
	3	2,257	0,150	93,4		3	0,491	10,437	2025,7
	4	2,061	0,107	94,8		4	0,534	4,850	808,2
	5	1,775	1,467	17,4		5	0,510	5,448	968,2
	6	1,908	4,428	132,1		6	0,000	17,721	---
	7	1,280	0,065	94,9		7	14,613	13,357	8,6
	8	1,966	0,005	99,7		8	0,000	11,740	---
	9	2,421	0,397	83,6		9	2,387	7,190	201,2
	10	0,528	1,123	112,7		10	1,893	5,010	164,7
	11	1,692	3,424	102,4		11	0,630	12,229	1841,1
	12	1,757	3,497	99,0		12	0,381	11,807	2999,0
C _{18:3}	1	7,237	3,477	52,0					
	2	1,921	3,563	85,5					
	3	1,076	3,389	215,0					
	4	1,116	2,362	111,6					
	5	1,437	2,055	43,0					
	6	1,186	2,543	114,4					
	7	7,237	3,737	48,4					
	8	0,346	3,461	900,3					
	9	2,122	2,743	29,3					
	10	0,382	2,009	425,9					
	11	1,011	2,127	110,4					
	12	1,049	2,010	91,6					

*%RD, porcentaje de diferencia relativa= ((Método FTIR-Método de Referencia) *100/Método de Referencia).

Los tamaños de las matrices para cada analito de la *Tabla 37* quedaron de la siguiente forma:

$C_{6:0}$	$X_{1279 \times 167}$	$Y_{167 \times 1}$	$C_{8:0}$	$X_{1279 \times 245}$	$Y_{245 \times 1}$	$C_{10:0}$	$X_{1279 \times 216}$	$Y_{216 \times 1}$
$C_{12:0}$	$X_{1279 \times 94}$	$Y_{94 \times 1}$	$C_{16:1}$	$X_{1279 \times 68}$	$Y_{68 \times 1}$	$C_{18:1}$	$X_{1279 \times 126}$	$Y_{126 \times 1}$
$C_{18:2}$	$X_{1279 \times 118}$	$Y_{118 \times 1}$	$C_{18:3}$	$X_{1279 \times 104}$	$Y_{104 \times 1}$			

Tabla 37: Autopredicción con mosto sintético húmedo y mosto real húmedo (Fermentaciones normales y problemáticas).

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Muestra excluidas cal	Muestra excluidas pred
$C_{6:0}$	Centrado y 1ª derivada y MSC	8	7,470	209,170	0,343	12, 21, 24, 27, 28, 30, 36, 38, 47	12, 120, 132
$C_{8:0}$	Centrado y 1ª derivada	9	1,172	222,320	0,340	12, 38, 44, 46, 51, 53, 80, 81, 86, 95, 100, 166	3, 12, 17, 30, 47
$C_{10:0}$	1ª derivada	9	6,466	166,510	0,373	12, 34, 77, 90, 95	3, 12, 160
$C_{12:0}$	Centrado y 1ª derivada	7	1,368	42,019	0,790	4, 12, 38, 72, 94	12, 94
$C_{16:1}$	MSC	9	7,621	87,458	0,608	24, 38, 66	67
$C_{18:1}$	1ª derivada	7	3,987	85,941	0,512	21, 24, 44, 70, 74	2, 3
$C_{18:2}$	1ª derivada	6	9,578	228,130	0,258	12, 13, 14, 15, 16, 17	12, 16, 93
$C_{18:3}$	Centrado y SNV	9	3,980	75,682	0,458	14, 15, 76	15, 102

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

De la *Tabla 37*, se puede inferir que ningún modelo cumplió con los criterios de aceptación para que éstos tuvieran una buena capacidad predictiva, los RMSEP estuvieron entre (75-228%). El R² estuvo más cercanos a 1 que los R² de los modelos de las *Tablas 32, 33 y 34*. Se observó una mayor correlación entre los valores predichos por PLS y reales por

GC-FID en la *Tabla 37*. El modelo para C_{12:0} fue el que más se acercó al modelo “esperado”.

No obstante, los RMSEP fueron mayores que los otros modelos mencionados posiblemente por:

- Principalmente por la gran incertidumbre en la determinación del método de referencia.
- Una mayor dispersión en los espectros.
- Mayor número de interferencias no simuladas en el modelo.

A continuación, se muestran en la *Tabla 38* los resultados de escoger un conjunto de muestras para la calibración [75%] donde se utilizaron muestras de mosto sintético húmedo y mosto real húmedo (Fermentaciones normales), y para la validación [25%] se usaron muestras de mosto real húmedo (Fermentaciones problemáticas).

Los tamaños de las matrices para cada analito quedaron de la siguiente forma:

C _{6:0}	Xcal _{1279x112} Xval _{1279x38} Ycal _{112x1} Yval _{38x1}	C _{8:0}	Xcal _{1279x165} Xval _{1279x55} Ycal _{165x1} Yval _{55x1}	C _{10:0}	Xcal _{1279x146} Xval _{1279x48} Ycal _{146x1} Yval _{48x1}
C _{12:0}	Xcal _{1279x64} Xval _{1279x21} Ycal _{64x1} Yval _{21x1}	C _{16:1}	Xcal _{1279x46} Xval _{1279x15} Ycal _{46x1} Yval _{15x1}	C _{18:1}	Xcal _{1279x85} Xval _{1279x28} Ycal _{85x1} Yval _{28x1}
C _{18:2}	Xcal _{1279x80} Xval _{1279x26} Ycal _{80x1} Yval _{26x1}	C _{18:3}	Xcal _{1279x70} Xval _{1279x24} Ycal _{70x1} Yval _{24x1}		

Tabla 38: Mosto sintético húmedo y mosto real húmedo (Fermentaciones normales) [cal75%] y mosto real húmedo (Fermentaciones problemáticas) [val 25%].

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Muestra excluidas cal	Muestra excluidas pred
C _{6:0}	Centrado	5	2,305	72,242	-107,400	19, 21, 30, 65, 74	20, 34, 35
C _{8:0}	Centrado y 1ª derivada	7	7,924	124,590	-471,700	12, 38, 44, 46, 49, 50, 51, 53	52, 53, 54, 55
C _{10:0}	Centrado y 1ª derivada	9	3,200	69,331	-10,570	12, 34, 42, 45	31, 45, 46, 47, 48
C_{12:0}	Detrend	6	1,607	41,562	0,304	12	
C _{16:1}	Centrado	5	9,830	109,810	-43,460	24	
C _{18:1}	1ª derivada	7	4,614	101,450	-0,897	15, 30, 31, 32, 33	
C _{18:2}	Centrado	4	9,349	272,100	-0,175	9, 12, 13, 14	
C _{18:3}	MSC	4	8,014	247,350	-1,273	16, 51	9, 10, 11, 20, 21, 22

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

Los modelos presentados en la *Tabla 38*, son consistentes con los modelos de la autopredicción de los modelos de la *Tabla 37*. Para el C_{12:0} los RMSEP dieron similares en ambas tablas, pero el R² en la *Tabla 38* fue menor, indicando así que la selección de muestras para construir las matrices tuvo una peor correlación.

En general, para construcción de las matrices se escogieron en un orden definido en todas las tablas anteriores (autopredicción, calibración y validación), por lo tanto, se quiso explorar con un algoritmo que pudiera escoger las muestras de una forma aleatoria, este algoritmo se llama *Kennard-Stone (KS)*^{111,112}, y consiste en escoger las mejores muestras (que tengan un menor error) para el calibrado.

El algoritmo se probó para el C_{12:0} y C_{16:1} que fueron los que tuvieron menores RMSEP y mayores R² en la autopredicción de la *Tabla 37*.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 39: Modelos con *Kennard-Stone*.

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	*RMSEC	**RMSEP	***R ²	Región espectral (cm ⁻¹)	Muestra excluidas cal	Muestra excluidas pred
C _{12:0}	1ª derivada	5	1,014	30,176	0,600	1450-2721	11, 29, 64	
C _{16:1}	SNV	9	1,095	129,450	0,426		27, 36, 44	10, 13

El uso del algoritmo *Kennard-Stone (KS)*¹¹³ mejoró significativamente los resultados obtenidos en la *Tabla 39* para los analitos seleccionados. Se quiso probar el modelo para C_{12:0} realizando una predicción de las concentraciones para este analito (ver *Tabla 40*), para esto se seleccionaron 9 muestras diferentes a las que se usaron para construir el modelo de calibración y validación.

Tabla 40: Predicción para el C_{12:0} del modelo con *Kennard-Stone*.

Muestra	Método de Referencia (GC)	Valores predichos (FT-IR)	%RD*
1	1,00	2,99	199,00
2	8,67	3,37	61,13
3	7,49	3,55	52,60
4	6,65	3,76	43,46
5	7,78	3,85	50,51
6	6,49	3,49	46,22
7	3,04	3,63	19,41
8	2,56	3,34	30,47
9	1,85	3,42	84,86

*%RD, porcentaje de diferencia relativa=

((Método FTIR-Método de Referencia) *100/Método de Referencia).

Se compararon las concentraciones halladas por PLS y por el método de referencia (ver *Tabla 40*), los porcentajes de error fueron muy altos (20-200%) para las 9 muestras, las cuales no cumplen con el criterio de aceptación (<10%). Estos resultados están acordes a lo esperado ya que el modelo hallado en la *Tabla 39*, no cumplió con todos los requerimientos para que sea un buen modelo predictivo como se ha mencionado por las razones anteriormente expuestas.

4.3.2 Aminoácidos

4.3.2.1 Autopredicción de aminoácidos en mostos reales (Fermentaciones normales).

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al aplicar los diferentes métodos de preprocesamiento a los espectros obtenidos de mosto real (fermentaciones normales) por RMN (ver *Tabla 41*). Se realizó autopredicción con el modelo PLS para cada uno de los analitos, utilizando los valores de referencia de aminoácidos determinados por HPLC-UV. Los tamaños de las matrices para cada analito quedaron de la siguiente forma:

$C_{Ac.glutámico}$	$X_{32768 \times 7}$	$C_{Alanina}$	$X_{32768 \times 8}$
	$Y_{7 \times 1}$		$Y_{8 \times 1}$
$C_{Glutamina}$	$X_{32768 \times 7}$	$C_{Arginina}$	$X_{1279 \times 68}$
	$Y_{7 \times 1}$		$Y_{8 \times 1}$

Tabla 41: Autopredicción de aminoácidos en mostos reales (F.normales).

Variable dependiente	Método preprocesamiento	Número de Factores	RMSEC	RMSEP	R ²	Muestra excluidas cal
Ácido glutámico	Detrend	7	152,800	74,550	-1,498	7
Glutamina	Centrado	1	3,318	18,695	0,305	
Alanina	SNV	2	21,024	68,803	0,203	8
Arginina	SNV	2	36,704	62,059	0,319	5

*RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration): Error cuadrático medio de calibración

**RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction): Error cuadrático medio de predicción

***R²: Coeficiente de correlación

El uso del algoritmo *Kennard-Stone* demostró que optimiza y mejora el modelo al aplicarse ya que escoge las mejores muestras para la calibración, por esta razón se recomienda el uso de este algoritmo para mejorar los resultados de la *Tabla 41*.

Se pudo obtener un modelo adecuado para la glutamina, los RMSEP fue de 18,7%, sin embargo, el R^2 de 0,305 muy inferior de obtener una buena correlación. Se puede inferir que el congelamiento de las muestras afectó drásticamente los resultados de las calibraciones.

En resumen, los modelos desarrollados con PLS no tuvieron una buena capacidad predictiva probablemente por:

- Gran dispersión en los espectros.
- Las concentraciones de referencia tuvieron una amplia variabilidad, la fuente principal de error fue el congelamiento de las muestras ya que estas sufrieron cambios químicos.
- No hubo una buena correlación entre los espectros y las concentraciones de referencia, ya que las muestras eran diferentes.

Las soluciones que se proponen para mejorar el modelo son:

- No congelar las muestras, y garantizar que sean las mismas tanto para la toma del espectro como para el método de referencia.
- Utilizar el algoritmo *Kennard-Stone*, el cual demostró que optimiza y mejora el modelo al escoger las mejores muestras para la calibración.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES GENERALES

Las metodologías analíticas desarrolladas en el marco de esta tesis representan un avance para el estudio de la fermentación alcohólica del vino *Carménère*. Siendo el principal objetivo de este trabajo predecir el contenido de ácidos grasos y aminoácidos utilizando espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (IR-TF) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución respectivamente, en combinación con métodos quimiométricos. A pesar de la alta complejidad de la matriz (mosto en fermentación), fue posible desarrollar las metodologías analíticas (GC-FID y HPLC-UV) con adecuada sensibilidad, selectividad, linealidad, precisión y exactitud que permitió cuantificar los analitos de interés en dichas muestras.

- a)** Se desarrolló y validó la metodología analítica por GC-FID para la identificación y cuantificación de nueve ácidos grasos $C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico) e insaturados ($C_{14:1}$ miristoleico, $C_{16:1}$ palmitoleico, $C_{18:1}$ oleico, $C_{18:2}$ linoléico, $C_{18:3}$ linolénico).

-Se evaluaron las cifras de mérito como especificidad, selectividad, LDM, LQM, linealidad, precisión y exactitud. Mediante el diseño experimental y la evaluación estadística de los resultados, se demostró que el método analítico es específico, selectivo, lineal, preciso ($CV < 10\%$) y exacto ($t_{exp} < t_{tab}$) en el intervalo de las concentraciones estudiadas.

-La alta variabilidad del contenido de ácidos grasos en fermentaciones normales y problemáticas se le atribuye al hecho de haber congelado la muestra, ya que esta no es la misma cuando sufre este efecto.

- b)** Se pudo identificar los ácidos grasos de cadena media y cadena larga insaturados mediante espectroscopia IR-TF en el rango medio (MIR) para mosto sintético, y mosto real que incluye fermentaciones normales y problemáticas.

-Se evaluó dos formas de toma de muestra (seca y húmeda), las cuales no hubo diferencia en la información espectral entregada.

- c) Los modelos desarrollados con mosto sintético en su forma húmeda y seca cumplieron los criterios de aceptación para modelo con buena capacidad predictiva, con RMSEP (<35%) y R^2 por encima de 0,990. Se pudo autopredecir el contenido de cada ácido graso de cadena media ($C_{6:0}$ caproico, $C_{8:0}$ caprílico, $C_{10:0}$ cáprico, $C_{12:0}$ laúrico) e insaturados ($C_{14:1}$ miristoleico, $C_{16:1}$ palmitoleico, $C_{18:1}$ oleico, $C_{18:2}$ linoléico, $C_{18:3}$ linolénico) en mosto sintético. Sin embargo, para el mosto real de fermentaciones normales y problemáticas no se pudo obtener un modelo aceptable para predecir las concentraciones de dichos analitos debido a que las muestras eran diferentes cuando se les tomó el espectro y cuando se cuantificaron.
- d) Mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en la modalidad de fase reversa y detección directa al UV a 280 nm, fue posible la implementación y validación de esta técnica para la identificación y cuantificación de α -aminoácidos (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina) en mostos de fermentaciones normales. Para la validación del método se determinaron las cifras de mérito como: LDM, LQM, linealidad, precisión (repetitividad y precisión intermedia) y exactitud las cuales pasaron los criterios de aceptación, por tanto, el método es adecuado para el análisis.
- e) Se identificó los α -aminoácidos (Ac. L-glutámico, L-arginina, DL-alanina, L-glutamina y L-prolina) mediante espectroscopia RMN de alta resolución de estándares de referencia, y se verificó la presencia de alanina y prolina en mostos de fermentaciones normales con la aplicación de la técnica TOCSY de la cepa *Carménère*.
- Este trabajo, demostró el enorme potencial de la técnica de Resonancia Magnética Nuclear como herramienta para el seguimiento de procesos biológicos como es la fermentación alcohólica. La RMN como análisis de metabolitos abre un mundo de posibilidades para el conocimiento y control de un proceso tan complejo como es la transformación de mosto en vino.

-Se presentó una nueva manera de determinar sustancias como aminoácidos de un mosto en fermentación en un menor tiempo que las técnicas convencionales. En el futuro se requiere automatizar el proceso, para obtener una mayor información cuantitativa y realizar análisis de datos mediante diversas herramientas quimiométricas.

f) Se desarrollaron los modelos de calibración y validación con la herramienta quimiométrica PLS, basados en medidas de RMN y HPLC-UV.

-Se pudo obtener autopredicciones para los aminoácidos con errores altos debido a la gran variabilidad en la cuantificación por HPLC-UV, también asociado al congelamiento de la muestra principalmente y que no era la misma cuando se tomó el espectro por RMN.

Finalmente, la primera hipótesis de esta tesis fue comprobada.

La segunda hipótesis de esta tesis no fue comprobada.

CAPÍTULO 6

6. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados de este trabajo de tesis se sugiere lo siguiente:

- 1) Continuar este estudio con un grupo nuevo de fermentaciones de la cepa *Carménère*, donde las muestras no se congelen y se puedan determinar los analitos de inmediato por GC-FID.
- 2) Desarrollar nuevas calibraciones con el grupo de fermentaciones nuevo y predecir concentraciones.
- 3) Se recomienda robustecer el modelo para RMN (mayor número de muestras) ya que solo se usaron entre 7-8 muestras, preparar un set de mosto sintético, y de muestras reales.
- 4) Las metodologías desarrolladas tienen un alto interés a nivel de la industria vitivinícola y pueden ser empleadas para la cuantificación de ácidos grasos y aminoácidos en fermentaciones alcohólicas de la cepa *Carménère*. Sin embargo, se recomienda mejorar el modelo.

CAPÍTULO 7

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Boulton, R. B.; Singleton, V. L.; Bisson, L. F.; Kunkee, R. E. *Principles and Practices of Winemaking*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (2) Robinson, A. L.; Boss, P. K.; Solomon, P. S.; Trengove, R. D.; Heymann, H.; Ebeler, S. E. Origins of Grape and Wine Aroma. Part 1. Chemical Components and Viticultural Impacts. *Am. J. Enol. Vitic.* **2014**, *65* (1), 1–24.
- (3) Jackson, R. S. *Wine Science: Principles and Applications.*; Academic Press: San Diego, 2008.
- (4) Mesas, J. M.; Alegre, M. T. El Papel De Los Microorganismos En La Elaboración Del Vino the Role of the Microorganisms in Winemaking O Papel Dos Microorganismos Na Elaboración Do Viño. *Cienc. y Tecnol. Aliment.* **1999**, *2* (4), 174–183.
- (5) Hinojosa Retamales, A. I. Evaluación de La Eficiencia de Diseños de Experimentos D-Óptimo En La Modelación de Procesos Biológicos: Fermación Alcohólica Como Caso de Estudio., Universidad Técnica Federico Santa María, 2013.
- (6) Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. *Bioquímica.*; Education., M. A. W. P., Ed.; 2002.
- (7) Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. Yeast and Its Importance to Wine Aroma - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* **2000**, *21* (Special Issue), 97–129.
- (8) Nissen, T. L.; Schulze, U.; Nielsen, J.; Villadsen, J. Flux Distributions in Anaerobic, Glucose-Limited Continuous Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology* **1997**, *143* (1), 203–218.
- (9) Liu, L.; Redden, H.; Alper, H. S. Frontiers of Yeast Metabolic Engineering: Diversifying beyond Ethanol and *Saccharomyces*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24* (6), 1023–1030.
- (10) Torija, M. J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Rozès, N. Effects of Fermentation Temperature and *Saccharomyces* Species on the Cell Fatty Acid Composition and Presence of Volatile Compounds in Wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *85* (1–2), 127–136.

- (11) Pszczółkowski, P.; Carriles, P.; Cumsille, M.; Maklouf, M. Reflexiones Sobre La Madurez de Cosecha y Las Condiciones de Vinificación, Con Relación a La Problemática de Fermentaciones Alcohólicas Lentas y/o Paralizantes En Chile. *Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile*. 2001.
- (12) Alexandre, H.; Charpentier, C. Biochemical Aspects of Stuck and Sluggish Fermentation in Grape Must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *20* (1), 20–27.
- (13) Santamaria, M. P.; Lopez, R.; Gutierrez, A. R.; Diez, C. A.; Bethencourt, D. Incidence de La Température de Fermentation Sur l'évolution Des Acides Gras Totaux. **1995**, *29*, 101–104.
- (14) Torija, M. J.; Beltran, G.; Novo, M.; Poblet, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Rozès, N. Effects of Fermentation Temperature and *Saccharomyces* Species on the Cell Fatty Acid Composition and Presence of Volatile Compounds in Wine. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *85* (1–2), 127–136.
- (15) Malherbe, S.; Bauer, F. F.; Du Toit, M. Understanding Problem Fermentations - A Review. *South African J. Enol. Vitic.* **2007**, *28* (2), 169–186.
- (16) Tronchoni, J.; Rozès, N.; Querol, A.; Guillamón, J. M. Lipid Composition of Wine Strains of *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae* Grown at Low Temperature. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *155* (3), 191–198.
- (17) Beltran, G.; Novo, M.; Guillamón, J. M.; Mas, A.; Rozès, N. Effect of Fermentation Temperature and Culture Media on the Yeast Lipid Composition and Wine Volatile Compounds. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *121* (2), 169–177.
- (18) Ribereau-Gayon, P. Réflexions Sur Les Causes et Les Conséquences Des Arrêts de La Fermentation Alcoolique En Vinification. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1999**, *33*(1), 39–48.
- (19) Jones, M.; Pierce, J. S. Absorption of Amino Acids From Wort By Yeasts. *J. Inst. Brew.* **1964**, *70* (4), 307–315.
- (20) Lekkas, C.; Stewart, G. G. G.; Hill, A. E. E.; Taidi, B.; Hodgson, J. Elucidation of the Role of Nitrogenous Wort Components in Yeast Fermentation. *J. Inst. Brew.* **2007**, *113* (1), 3–8.
- (21) Medina, K.; Carrau, F. M.; Gioia, O.; Bracesco, N. Nitrogen Availability of Grape Juice Limits Killer Yeast Growth and Fermentation Activity during Mixed-

- Culture Fermentation with Sensitive Commercial Yeast Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63* (7), 2821–2825.
- (22) Mauricio, J. C.; Millán, C.; Ortega, J. M. Influence of Oxygen on the Biosynthesis of Cellular Fatty Acids, Sterols and Phospholipids during Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* and *Torulaspora Delbrueckii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 405–410.
- (23) Blateyron, L.; Sablayrolles, J. M. Stuck and Slow Fermentations in Enology: Statistical Study of Causes and Effectiveness of Combined Additions of Oxygen and Diammonium Phosphate. *J. Biosci. Bioeng.* **2001**, *91* (2), 184–189.
- (24) Bardi, L.; Cocito, C.; Marzona, M. *Saccharomyces Cerevisiae* Cell Fatty Acid Composition and Release during Fermentation without Aeration and in Absence of Exogenous Lipids. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *47* (1–2), 133–140.
- (25) Coetzee, C.; Lisjak, K.; Nicolau, L.; Kilmartin, P.; du Toit, W. J. Oxygen and Sulfur Dioxide Additions to Sauvignon Blanc Must: Effect on Must and Wine Composition. *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28* (3), 155–167.
- (26) Gallart, M.; Francioli, S.; Viu-Marco, A.; López- Tamames, E.; Buxaderas, S. Determination of Free Fatty Acids and Their Ethyl Esters in Musts and Wines. *J. Chromatogr. A* **1997**, *776*, 283–291.
- (27) Wade, L. G., Pedrero, Á. M., García, C. B. *Química Orgánica*; Pearson prentice hall., 2004.
- (28) Ayestarán, B.; Garrido, J.; Ancín, C. Relation between Fatty Acid Content and Its Evolution during Fermentation and Utilization of Free Amino Acids in Vacuum-Filtered Viura Must. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (1), 42–48.
- (29) Yunoki, K.; Tanji, M.; Murakami, Y.; Yasui, Y.; Hirose, S.; Ohnishi, M. Fatty Acid Compositions of Commercial Red Wines. *Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, *68* (12), 2623–2626.
- (30) Kosir, I. J.; Kidric, J. Identification of Amino Acids in Wines by One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *J Agric Food Chem* **2001**, *49* (1), 50–56.
- (31) Soufleros, E. H.; Bouloumpasi, E.; Tsarchopoulos, C.; Biliaderis, C. G. Primary Amino Acid Profiles of Greek White Wines and Their Use in Classification

- According to Variety, Origin and Vintage. *Food Chem.* **2003**, *80* (2), 261–273.
- (32) Lehtonen, P. Determination of Amines and Amino Acids in Wine - A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47* (2), 127–133.
- (33) Lee, J. E.; Hwang, G. S.; Van Den Berg, F.; Lee, C. H.; Hong, Y. S. Evidence of Vintage Effects on Grape Wines Using ¹H NMR-Based Metabolomic Study. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *648* (1), 71–76.
- (34) Valero, E.; Millán, C.; Ortega, J. M.; Mauricio, J. C. Concentration of Amino Acids in Wine after the End of Fermentation By *Saccharomyces Cerevisiae* Strains. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83* (8), 830–835.
- (35) Urtubia, A. Monitoring Large Scale Wine Fermentations with Infrared Spectroscopy. *Talanta* **2004**, *64* (3), 778–784.
- (36) Urtubia, A.; Pérez-correa, J. R.; Pizarro, F.; Agosin, E. Exploring the Applicability of MIR Spectroscopy to Detect Early Indications of Wine Fermentation Problems. *Food Control* **2008**, *19* (4), 382–388.
- (37) Fragoso, S.; Aceña, L.; Guasch, J.; Busto, O.; Mestres, M. Application of FT-MIR Spectroscopy for Fast Control of Red Grape Phenolic Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2011**.
- (38) Cozzolino, D.; Cynkar, W.; Shah, N.; Smith, P. Feasibility Study on the Use of Attenuated Total Reflectance Mid-Infrared for Analysis of Compositional Parameters in Wine. *Food Res. Int.* **2011**, *44* (1), 181–186.
- (39) Schmidtke, L. M.; Smith, J. P.; Müller, M. C.; Holzapfel, B. P. Rapid Monitoring of Grapevine Reserves Using ATR-FT-IR and Chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *732*, 16–25.
- (40) Anjos, O.; Santos, A. J. A.; Estevinho, L. M.; Caldeira, I. FTIR-ATR Spectroscopy Applied to Quality Control of Grape-Derived Spirits. *Food Chem.* **2016**, *205*, 28–35.
- (41) Fuentes, M.; Bosch, C.; Sánchez, F. Aplicación de La Espectroscopia Del Infrarrojo Medio En Química Analítica de Procesos. *Bol. Soc. Quím. Méx.* **2008**, *2* (3), 93–103.
- (42) Koca, N.; Rodriguez-Saona, L. E.; Harper, W. J.; Alvarez, V. B. Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Monitoring Short-Chain Free Fatty

- Acids in Swiss Cheese. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90* (8), 3596–3603.
- (43) Sun, D.-W.; Subramanian, A.; Rodriguez-Saona, L. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*; 2009.
- (44) Palma, M.; Barroso, C. G. Application of FT-IR Spectroscopy to the Characterisation and Classification of Wines, Brandies and Other Distilled Drinks. *Talanta* **2002**, *58* (2), 265–271.
- (45) D. Picque, T. C. and G. C. Classification of Red Wines Analysed by Middle Infrared Spectroscopy of Dry Extract According to Their Geographical Origin. **2001**, 165–170.
- (46) Fernandez, K.; Agosin, E. Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (24), 7294–7300.
- (47) Blanco, M.; Peinado, A. C.; Mas, J. Analytical Monitoring of Alcoholic Fermentation Using NIR Spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88* (4), 536–542.
- (48) Cozzolino, D., Parker, M., Damberg, R., Herderich, M., Gishen, M. Chemometrics and Visible-Near Infrared Spectroscopic Monitoring of Red Wine Fermentation in a Pilot Scales. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95* (6), 1101–1107.
- (49) Ozaki, Y.; Liu, Y. FT-NIR Spectroscopy of Some Long-Chain Fatty Acid and Alcohols. *Macromol. Symp* **1995**, *59*, 51–59.
- (50) Patz, C. D.; Blicke, a.; Ristow, R.; Dietrich, H. Application of FT-MIR Spectrometry in Wine Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 81–89.
- (51) Hernández-Martínez, M.; Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla, G.; Almaraz-Abarca, N.; Ponce-Mendoza, A.; Vásquez-Murrieta, M. S. Prediction of Total Fat, Fatty Acid Composition and Nutritional Parameters in Fish Fillets Using MID-FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *52* (1), 12–20.
- (52) Cozzolino, D.; Roumeliotis, S.; Eglinton, J. Evaluation of the Use of Attenuated Total Reflectance Mid Infrared Spectroscopy to Determine Fatty Acids in Intact Seeds of Barley (*Hordeum Vulgare*). *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, *56* (2), 478–483.

- (53) Maggio, R. M.; Kaufman, T. S.; Carlo, M. Del; Cerretani, L.; Bendini, A.; Cichelli, A.; Compagnone, D. Monitoring of Fatty Acid Composition in Virgin Olive Oil by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy Coupled with Partial Least Squares. *Food Chem.* **2009**, *114* (4), 1549–1554.
- (54) Ramos, A.; Santos, H. Nmr Studies Of Wine Chemistry And Wine Bacteria. *Annu. Reports NMR Spectrosc.* **1999**, *37* (C), 179–202.
- (55) Rodrigues, J. E. A.; Erny, G. L.; Barros, A. S.; Esteves, V. I.; Brandão, T.; Ferreira, A. A.; Cabrita, E.; Gil, A. M. Quantification of Organic Acids in Beer by Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Methods. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *674* (2), 166–175.
- (56) Saurina, J. Characterization of Wines Using Compositional Profiles and Chemometrics. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (3), 234–245.
- (57) Lopez-Rituerto, E.; Cabredo, S.; Lopez, M.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. A Thorough Study on the Use of Quantitative H-1 NMR in Rioja Red Wine Fermentation Processes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (6), 2112–2118.
- (58) López-Rituerto, E.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. Evidence of Metabolic Transformations of Amino Acids into Higher Alcohols through ¹³C NMR Studies of Wine Alcoholic Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (8), 4923–4927.
- (59) López-Rituerto, E.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M. NMR Study of Histidine Metabolism during Alcoholic and Malolactic Fermentations of Wine and Their Influence on Histamine Production. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (39), 9464–9469.
- (60) López-Rituerto, E.; Savorani, F.; Avenoza, A.; Busto, J. H.; Peregrina, J. M.; Engelsen, S. B. Investigations of La Rioja Terroir for Wine Production Using ¹H NMR Metabolomics. **2012**.
- (61) Du, Y. Y.; Bai, G. Y.; Zhang, X.; Liu, M. L. Classification of Wines Based on Combination of H-1 NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Chinese J. Chem.* **2007**, *25* (7), 930–936.
- (62) Nord, L. I.; Vaag, P.; Duus, J. O. Quantification of Organic and Amino Acids in Beer by H-1 NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (16), 4790–4798.

- (63) López-Rituerto, E.; Avenoza Aznar, A.; Busto Sancirión, J. H.; Peregrina García, J. M. Resonancia Magnética Nuclear En El Vino. Seguimiento de Las Fermentaciones Alcohólicas y Malolácticas En Vinos de Diferentes Subzonas de La D. O. CA. La Rioja. *Zubía* **2009**, No. 27, 203–219.
- (64) Pauli, G. F.; Jaki, B. U.; Lankin, D. C. Quantitative ¹H NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68 (1), 133–149.
- (65) Alañón, M. E.; Pérez-Coello, M. S.; Marina, M. L. Wine Science in the Metabolomics Era. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2015.
- (66) Fan, S.; Zhong, Q.; Fauhl-Hassek, C.; Pfister, M. K. H.; Horn, B.; Huang, Z. *Classification of Chinese Wine Varieties Using ¹H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis*; Elsevier Ltd, 2018; Vol. 88.
- (67) Mucherino, A.; Urtubia, A. Feature Selection for Datasets of Wine Fermentations. *10th Int. Conf. Model. Appl. Simulation, MAS 2011, Held Int. Mediterr. Lat. Am. Model. Multiconference, I3M 2011* **2011**.
- (68) Hu, B.; Yue, Y.; Zhu, Y.; Wen, W.; Zhang, F.; Hardie, J. W. Proton Nuclear Magnetic Resonance-Spectroscopic Discrimination of Wines Reflects Genetic Homology of Several Different Grape (*V. Vinifera* L.) Cultivars. *PLoS One* **2015**, 10 (12), 1–16.
- (69) Fotakis, C.; Zervou, M. NMR Metabolic Fingerprinting and Chemometrics Driven Authentication of Greek Grape Marc Spirits. *Food Chem.* **2016**, 196, 760–768.
- (70) Miller, N.; Miller, J. Estadística y Quimiometría Para Química Analítica. 2002, pp 221–243.
- (71) Abdi, H. Partial Least Squares Regression. In *Technometrics*; 1993; Vol. 35, pp 109–135.
- (72) Yeniay, O.; Goktas, A. A Comparison of Partial Least Squares Regression with Other Prediction Methods. *J. Math. Stat.* **2002**, 31, 99–111.
- (73) Martínez, M. Aplicación de La Espectroscopia NIR Al Control Analítico de Procesos de La Industria Química., 2007.
- (74) Olivieri, A. C. *Introduction to Multivariate Calibration*; Springer Nature

- Switzerland AG: Rosario, 2018.
- (75) Haaland, D. M.; Thomas, E. V. Partial Least-Squares Methods for Spectral Analyses. 1. Relation to Other Quantitative Calibration Methods and the Extraction of Qualitative Information. **1988**, 1193–1202.
- (76) Salmon, J.-M.; Barre, P. Improvement of Nitrogen Assimilation and Fermentation Kinetics under Enological Conditions by Depression of Alternative Nitrogen-Assimilatory Pathways in an Industrial *Saccharomyces Cerevisiae* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64 (10), 3831–3837.
- (77) Vilanova, M.; Ugliano, M.; Varela, C.; Siebert, T.; Pretorius, I. S.; Henschke, P. A. Assimilable Nitrogen Utilisation and Production of Volatile and Non-Volatile Compounds in Chemically Defined Medium by *Saccharomyces Cerevisiae* Wine Yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 77 (1), 145–157.
- (78) Official Methods of Analysis of AOAC International. *Fatty Acids in Oils and Fats AOAC Official Method 969.33*; 2000.
- (79) Shantha, N. C.; Napolitano, E.; Napolitano, G. E. Gas Chromatography of Fatty Acids. *J. Chromatogr. A* **1992**, 624 (1–2), 37–51.
- (80) Yurchenko, S.; Sats, A.; Poikalainen, V.; Karus, A. Method for Determination of Fatty Acids in Bovine Colostrum Using GC-FID. *Food Chem.* **2016**, 212, 117–122.
- (81) Petrović, M.; Kezić, N.; Bolanća, V. Optimization of the GC Method for Routine Analysis of the Fatty Acid Profile in Several Food Samples. *Food Chem.* **2010**, 122 (1), 285–291.
- (82) Izquierdo Cañas, P. M.; García Romero, E.; Gómez Alonso, S.; Fernández González, M.; Palop Herreros, M. L. L. Amino Acids and Biogenic Amines during Spontaneous Malolactic Fermentation in Tempranillo Red Wines. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, 21 (8), 731–735.
- (83) Hermosín, I.; Chicón, R. M.; Cabezudo, M. D. Free Amino Acid Composition and Botanical Origin of Honey. *Food Chem.* **2003**, 83 (2), 263–268.
- (84) Valderas, M. Implementación de Un Método Para Análisis de Aminoácidos Mediante HPLC, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2013.
- (85) Larsen, F. H., Berg F., Engelsen, S. B. An Exploratory Chemometric Study of

- 1HNMR Spectra of Table Wines. *J. Chemom.* **2006**, 198–208.
- (86) Alejandro C.Olivieri, Héctor C.Goicoechea, F. A. I. MVC1: An Integrated MatLab Toolbox for First-Order Multivariate Calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, 77 (2), 189–197.
- (87) La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
(accessed May 12, 2018).
- (88) Reglamento RTCA 11.01.35: 06 Técnico Centroamericano
http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/nic72_t.pdf (accessed May 12, 2018).
- (89) Beltrán, R. C.; Castro, A. R. *Garantía de La Calidad En Los Laboratorios Analíticos*; S.A., S., Ed.; 2010.
- (90) Miller, J. N; Miller, J. C. *Estadística Para Química Analítica*, Segunda Ed.; Addison-Wesley Iberoamerican, S.A.: Wilmington, Delaware, E.U.A, 1993.
- (91) Miller, J. N; Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Sixth edit.; Pearson Education Limited, 2010.
- (92) Ortega, L., Garcia, J., Fontanety, M. *Validación de Métodos Analíticos*; Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria, (AEFI), Ed.; Hewlett Pa.: Barcelona, España, 2001.
- (93) Suarez, R.; Arévalo, E.; Linares, L.; Ustáriz, F. Validación de Un Método Analítico Para La Determinación de Magnesio Eritrocitario. **2014**, No. June.
- (94) Boyer, K. W.; Horwitz, W.; Albert, R. Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. *Anal. Chem.* **1985**, 57 (2), 454–459.
- (95) Albert, R.; Horwitz, W. A Heuristic Derivation of the Horwitz Curve. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (4), 789–790.
- (96) Samar Al Makdessi, J.-L. A. and A. B. Assay of Lipids in Dog Myocardium Using Capillary Gas Chromatography and Derivatization with Boron Trifluoride and Methanol. **1985**, 339, 25–34.
- (97) Spayd, S. E. . N. H. A. Effect of Freezing Fruit on the Composition of Musts and Wines. **1987**, 38 (3), 243–245.
- (98) Zwietering, M. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M.; Van't Riet, K. Modeling

- of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56* (6), 1875–1881.
- (99) Duan, L. L.; Shi, Y.; Jiang, R.; Yang, Q.; Wang, Y. Q.; Liu, P. T.; Duan, C. Q.; Yan, G. L. Effects of Adding Unsaturated Fatty Acids on Fatty Acid Composition of *Saccharomyces Cerevisiae* and Major Volatile Compounds in Wine. *South African J. Enol. Vitic.* **2015**, *36* (2), 285–295.
- (100) Ayestarán, B.; Garrido, J.; Ancín, C. Relation between Fatty Acid Content and Its Evolution during Fermentation and Utilization of Free Amino Acids in Vacuum-Filtered Viura Must. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (1), 42–48.
- (101) Alexandre, H.; Charpentier, C. Biochemical Aspects of Stuck and Sluggish Fermentation in Grape Must. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *20* (1), 20–27.
- (102) Du Toit, W. J.; Marais, J.; Pretorius, I. S.; Du Toit, M. Oxygen in Must and Wine: A Review. *South African J. Enol. Vitic.* **2006**, *27* (1), 76–94.
- (103) Nobrega, M. M.; Olivato, J. B.; Mueller, C. M. O.; Yamashita, F. Biodegradable Starch-Based Films Containing Saturated Fatty Acids: Thermal, Infrared And Raman Spectroscopic Characterization. *Polim. E Tecnol.* **2012**, *22* (5), 475–480.
- (104) Collado González, C. P. Evolución de Las Concentraciones de Los Aminoácidos Durante El Curso de Fermentaciones Alcohólicas Con Diferentes de Oxígeno, Nitrógeno y Temperatura, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2014.
- (105) Chicón, R., Hermosin, I., & Cabezudo, M. D. Método de Análisis de Los Aminoácidos Libres y Del Ión Amonio En Vinos y Mostos, Por HPLC Tras Derivatización Con Etoximetilénmalonato de Dietilo (EMMDE). *Tecnol. del Vino* **2001**, *1*, 95–100.
- (106) Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast Autolysis in Sparkling Wine - A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12* (2), 119–127.
- (107) Bell, S. J.; Henschke, P. A. Implications of Nitrogen Nutrition for Grapes, Fermentation and Wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 242–295.
- (108) Garde-Cerdán, T.; Martínez-Gil, A. M.; Lorenzo, C.; Lara, J. F.; Pardo, F.; Salinas, M. R. Implications of Nitrogen Compounds during Alcoholic Fermentation from Some Grape Varieties at Different Maturation Stages and Cultivation Systems. *Food Chem.* **2011**, *124* (1), 106–116.

-
- (109) Callejón, R. M.; Troncoso, A. M.; Morales, M. L. Determination of Amino Acids in Grape-Derived Products: A Review. *Talanta* **2010**, *81* (4–5), 1143–1152.
- (110) Bharti, S. K.; Roy, R. Quantitative ^1H NMR Spectroscopy. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5–26.
- (111) Fragoso, S.; Aceña, L.; Guasch, J.; Mestres, M.; Busto, O. Quantification of Phenolic Compounds during Red Winemaking Using FT-MIR Spectroscopy and PLS-Regression. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 10795–10802.
- (112) Taylor, P.; Kennard, R. W.; Stone, L. A. Technometrics Computer Aided Design of Experiments. **2012**, No. February 2014, 37–41.
- (113) Jiménez-carvelo, A. M.; Osorio, M. T.; Koidis, A.; González-, A.; Cuadros-rodríguez, L. Chemometric Classification and Quantification of Olive Oil in Blends with Any Edible Vegetable Oils Using FTIR-ATR and Raman Spectroscopy. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de fermentación.

El protocolo para una fermentación alcohólica de vino se divide en las siguientes etapas:

1. Esterilización de materiales.
2. Tratamiento del mosto.
3. Preparación del fermentador y condiciones de operación.
4. Preparación del inóculo de levadura.
5. Inoculación.
6. Fermentación.
7. Seguimiento de la fermentación.

1. Esterilización de materiales

Todo el material de vidrio para análisis y almacenamiento de muestras debe ser esterilizado en autoclave o deben desinfectarse con metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) al 2%. Se debe tener claridad que el $K_2S_2O_5$ desinfecta, es decir, baja población microbiana, pero no esteriliza.

La esterilización se realiza a 121 °C por 18 min en el autoclave de 21 L marca AMILAB, presión máxima 20 psi. Es recomendable envolver el material con papel craft.

Precauciones:

- No sobrepasar la capacidad máxima del autoclave, los materiales a esterilizar de vidrio o metálicos, no se deben forzar o hacer presión entre ellos o contra la pared del equipo.
- Revisar que el nivel del agua dentro del autoclave sea el correcto.
- Asegurar cerrado hermético del equipo verificando el sello de la tapa y que todas las prensas estén bien ajustadas.
- Verificar el cerrado de la válvula de venteo y de seguridad.
- Usar guantes térmicos para la apertura y retiro de materiales del autoclave.

La desinfección con $K_2S_2O_5$ debe ser para todo el material no esterilizable que se encuentre en contacto directo o indirecto con el mosto, como lo son: Mangueras, sensores, sellos, trampas y resistencias internas.

Procedimiento:

- Preparar una solución al 2% de $K_2S_2O_5$ (el volumen requerido depende de la cantidad de materiales que se pretendan desinfectar).
- Sumergir los implementos dentro de la solución de $K_2S_2O_5$ completamente y dejar reposar por lo menos 12 h.
- Verter agua hirviendo dentro de la solución para la eliminación de gran parte del SO_2 generado (realizar esto preferiblemente bajo campana o con mascarilla).
- Finalmente, purgar los instrumentos con agua destilada.

2. Tratamiento del mosto

Los tratamientos que se realizan previamente o durante las determinaciones experimentales, tienen por objetivo preparar o acondicionar la muestra de mosto a analizar, sin que se presenten interferencias al ser utilizadas o que afecten la calidad del vino resultante.

El mosto es el medio de cultivo que proveerá al microorganismo (levadura), de todos los nutrientes necesarios para su reproducción y crecimiento.

El mosto puede ser real (mosto de uva) o sintético (simulación de mosto de uva real con un medio definido). Según su clasificación es su preparación y acondicionamiento.

- **Mosto real o jugo de uva no filtrado:** Su procedencia puede ser de una viña o bodega. Idealmente antes del despacho del mosto al laboratorio verificar que el nivel del SO_2 libre sea el adecuado, aproximadamente en 35 mg/L, esto es para asegurar la conservación.

- **Mosto sintético:** La composición de este medio definido se hace simulando el mosto real, la más utilizada para estudios de vino es el medio sintético propuesto por Salmón, *et al.*, (1998). Por lo tanto, una vez preparado el medio sintético es usado como medio de cultivo para las levaduras. Los ajustes previos a la inoculación y fermentación son la sulfitación, pH y nitrógeno.

a) Descarbonización de mosto

El gas carbónico (CO₂) contenido en el mosto modifica el resultado de algunas determinaciones como la acidez total, acidez volátil o densidad. Por tanto, hay que eliminarlo de las muestras a analizar. Esto es especialmente indispensable para los vinos durante la fermentación alcohólica o maloláctica, pero también para ciertos vinos jóvenes que todavía no se han trasegado.

La eliminación del gas carbónico o descarbonización, puede obtenerse sometiendo la muestra a un vacío parcial.

En caso de realizarse una dilución de la muestra, se puede utilizar agua en ebullición, y dejar enfriar a temperatura ambiente.

b) Corrección de la acidez

Una sobre maduración puede ser la causa de mostos con acidez baja, mientras que una madurez insuficiente se traduce en una acidez elevada. Estos defectos se pueden corregir con una acidificación o desacidificación.

El pH debe ser ajustado a 3,5 con soluciones ácidas o básicas. Las más usadas en fermentaciones de vino son bicarbonato potásico (K₂CO₃) y ácido tartárico (C₄H₆O₆). También suelen utilizarse hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) a 2 N, pero son menos recomendadas.

➤ **Acidificación:**

Esta operación se realiza con ácido tartárico que tiene como función bajar el pH y hacer el vino menos sensible a los ataques bacterianos.

Cuando se considera una acidificación, debe realizarse lo más pronto posible al comienzo de la fermentación alcohólica. Generalmente, una adición de 100 g de ácido tartárico por hectolitro de vino es suficiente.

➤ **Desacidificación:**

Productos como el bicarbonato potásico y carbonato de calcio actúan principalmente sobre el ácido tartárico. Hay desprendimiento de gas carbónico y formación de bitartrato potásico (crémor tártaro) lo que conlleva que baje la acidez total y el pH aumente, y en consecuencia el desarrollo de bacterias lácticas se favorece, provocando una fermentación maloláctica. Además, si el mosto es congelado o refrigerado tiene la desventaja de disminuir la cantidad de bitartrato de potasio debido a que precipita durante su almacenaje.

El carbonato cálcico (CaCO_3) añadido al mosto o al vino, reacciona principalmente con el ácido tartárico, formando tartrato neutro de calcio, que precipita rápidamente desacidificando los mismos, aunque en algunos casos las insolubilizaciones pueden alargarse con el tiempo. Aproximadamente 1,0 g/L de CaCO_3 es capaz de bajar la acidez total en 1,0 g/L expresada en ácido sulfúrico o 1,5 g/L en ácido tartárico. El bicarbonato potásico (KHCO_3) añadido al mosto o al vino, también reacciona con el ácido tartárico produciendo bitartrato potásico (KHT), que se insolubiliza de una manera más eficaz que con el carbonato cálcico. En este caso 1,5 g/L de bicarbonato potásico, reduce la acidez total en 1.0 g/L expresada en ácido sulfúrico o 1,5 g/L en ácido tartárico.

c) Adición de SO_2

El anhídrido sulfuroso (SO_2) se utiliza en vinificación por sus propiedades antioxidante y antiséptica, debe ser utilizado con precaución ya que puede ser origen de olores o sabores desagradables o favorecer ciertos problemas durante la conservación.

Cuando se adiciona al mosto, una parte se combina con algunos constituyentes (azúcares, algunas sustancias de uvas descompuestas, productos secundarios de la fermentación, aire). Solo la parte libre tendrá un efecto protector, por eso, es deseable que el SO₂ se combine lo menos posible. Entre las formas libre y combinada, se produce un fenómeno de compensación, es decir, que si se añade SO₂ se combina siempre una parte. Si hay una pérdida de SO₂ (por trasiego), es el SO₂ libre que se pierde; pero un poco de SO₂ combinado se libera para reemplazarlo.

Cuando las cantidades de SO₂ utilizadas son altas, se corre el riesgo de sobrepasar las normas legales, puede ser útil conocer el SO₂ libre y el SO₂ total, y así determinar el contenido de SO₂ combinado del vino: Esto es un buen indicador del estado de un vino.

La dosis para emplear en los mostos o vinos son muy variables, se recomienda una dosis de SO₂ entre 30 a 50 mg/L antes de la fermentación que equivale entre 60 a 100 mg/L de metabisulfito de potasio, o sea aporta la mitad de su peso de SO₂ requerida.

Generalmente, los valores de SO₂ libre deben ser de 35mg/L por normativa chilena.

d) Adición de nitrógeno

Cuando el contenido de nitrógeno en el mosto es insuficiente, presentan problemas de calidad, por lo que es necesario agregar nitrógeno al mosto, permitiendo a las levaduras desarrollarse normalmente y llevar a término la fermentación alcohólica. Generalmente, esto se soluciona a través de sales de amonio como el fosfato de amonio o diammonium phosphate (DAP).

Nitrógeno asimilable: Se determina en su forma de YAN (Yeast Assimilable Nitrogen) y se ajusta con DAP a una concentración superior a los 200-250 mg/L para evitar fermentaciones lentas o paralizadas.

e) Aireación

La aireación, se utiliza con el fin de saturar al medio con oxígeno necesario para el metabolismo de la levadura, pero esta no es vital en el proceso, normalmente la aireación es a criterio del enólogo.

Consideraciones generales:

- El mosto debe ser transportado en condiciones de refrigeración.
- Ser almacenado en una cámara de congelamiento a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$, si no va a ser utilizado inmediatamente.
- Iniciar el proceso de descongelación pasando primero de la cámara de congelamiento a una cámara de refrigeración, y posteriormente sacarlo a la temperatura ambiente.
- Hay que considerar que el mosto puede estar sulfitado, no obstante, debe determinarse SO_2 libre y total antes de iniciar la fermentación, esto se realiza para corroborar las concentraciones y por si hay que realizar algún ajuste.
- Debe caracterizarse, es decir, conocer las concentraciones iniciales de azúcar, nitrógeno, SO_2 libre y total, acidez y pH.

3. Preparación del fermentador y condiciones de operación

Una vez que se ha vertido el mosto al fermentador, se procede a ajustar los parámetros de operación (temperatura, agitación y aireación), independiente si el fermentador es un matraz o un fermentador de mayor volumen (4 L o más).

- **Temperatura:** Corresponderá a la temperatura óptima según la variedad de mosto a fermentar o vino a producir, siendo usualmente para vino blanco entre los $13\text{-}18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tinto entre $25\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Agitación:** Generalmente se mantiene una agitación suave y constante alrededor de $100\text{-}120\text{ rpm}$ (dependiendo de la cantidad de aspas y forma del agitador) para homogeneizar el medio de fermentación.
- **Aireación:** Si bien la fermentación es anaerobia, las levaduras requieren de ciertos niveles de oxígeno para su viabilidad al final de la fermentación alcohólica. Por este motivo, existen diferentes estrategias de aireación que dependen de cada

enólogo. Algunos mantienen un ambiente estrictamente anaerobio, y otros agregan oxígeno o aire en distintas etapas de la fermentación (al inicio o inicio/final de la fase exponencial). Esto debe aplicarse según objetivos de la experimentación.

La aireación del mosto debe estar entre 4-8 mg/L de oxígeno disuelto, ésta debe realizarse inmediatamente después de inocular. Para reproducir condiciones reales se burbujea aire en el medio de cultivo real o sintético.

4. Preparación del inóculo de levadura

En la mayoría de los casos, las levaduras se preparan según las especificaciones del fabricante. Según Boulton, *et al.*, (2013) la dosis recomendada es cercana a 0,1-0,2 g de levadura seca en 1 L de mosto, dando una concentración inicial de 10^6 células/mL. Generalmente, se mezcla la levadura en agua caliente (35-40 °C) o con una mezcla 1:1 de mosto y agua destilada. Se deja reactivar por 30 min, agitando a los 10 y 15 min.

5. Inoculación

Previo a inocular, se debe verificar que la diferencia de temperatura entre la levadura y el mosto dentro del fermentador sea inferior a 5 °C.

6. Fermentación

La fermentación comienza una vez que ha entrado en contacto la levadura con el mosto. Los parámetros operacionales deben mantenerse en los rangos de trabajo establecidos, por ejemplo, el nivel de nitrógeno asimilable para que no se produzca limitación del nutriente se debe mantener en las concentraciones indicadas. Al mismo tiempo puede oxigenarse en distintos instantes de la fermentación.

En una fermentación normal, generalmente se comienza con un rango de 22-24 °Brix equivalente a una concentración entre 220-240 g/L de azúcares totales, y finaliza entre 2-

4 g/L que son los azúcares residuales y se infiere que la fermentación alcohólica fue completa.

7. Seguimiento de la fermentación

Distintas variables pueden ser monitoreadas durante la fermentación. Las determinaciones más clásicas son: °Brix, densidad, azúcares reductores, etanol o grado alcohólico, acidez total y volátil, células totales y viables, nitrógeno, SO₂ total y libre, etc. Para poder seguir la evolución de la fermentación debe muestrearse según la frecuencia necesaria para el estudio, por ejemplo, cada 12 o 24 horas y en duplicado o triplicado para cada análisis.

7.1 Análisis experimental:

i. Determinación de densidad

Materiales:

Picnómetro

Balanza analítica

Procedimiento:

1. Pesar el picnómetro seco.
2. Llenar el picnómetro con muestra hasta el tope y pesar.
3. La masa de muestra corresponde a la diferencia entre el picnómetro lleno y el picnómetro vacío.
4. El volumen del picnómetro corresponde a la masa de muestra dividido la densidad de la muestra a la temperatura que se encuentre.

$$\rho (20\text{ }^{\circ}\text{C}) \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{(\text{Masa picnómetro con muestra} - \text{Masa picnómetro vacío})}{\text{Volumen picnómetro}} \quad (37)$$

$$\rho (20\text{ }^{\circ}\text{C}) \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right] = \frac{(\text{Masa picnómetro con muestra} - \text{Masa picnómetro vacío})}{\text{Volumen picnómetro}}$$

La densidad es altamente afectada por la temperatura, por esta razón llevar la muestra a 20 °C antes de realizar el procedimiento.

ii. Determinación pHMateriales:

Vaso precipitado 100 mL

Potenciómetro

Soluciones buffer pH 4, 7 y 10

Procedimiento:

1. Calibrar el electrodo siempre antes de realizar la determinación.
2. Tomar aproximadamente 30 mL de la muestra.
3. Lavar el electrodo con agua destilada y secar.
4. Introducir el electrodo en la muestra.
5. Registrar el pH estable junto con la temperatura.
6. Lavar con agua destilada el electrodo y dejar sumergido en la solución de almacenamiento.

iii. Determinación de Acidez Total (Potenciométrico)

El siguiente procedimiento aplica al titulador automático (Titroline easy).

Materiales:

Vaso precipitado 100 mL

Soluciones estandarizadas

Probeta 100 mL

Potenciómetro

Procedimiento:

1. Calibrar con los buffers (4, 7 y 10) el titulador automático. Lavar y secar el electrodo cada vez que se cambie de una solución a otra.
2. Tomar una muestra de 3 mL y adicionar agua hervida hasta los 60 mL aproximadamente.

3. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y proceder con la medición ajustando el valor de pH a 7,0. Para poder medir, se introduce el electrodo en la muestra manteniendo una agitación constante.
4. La titulación termina cuando llega a pH 7,0.

iv. Determinación de Acidez volátil

Materiales:

Equipo Cash Still

Bureta de Mohr

Mechero

Hidróxido de sodio 0,1 N

Fenolftaleína

Antiespumante de silicona

Procedimiento:

1. Remover el CO₂ de una muestra de 20 mL mediante vacío.
2. Agregar 250 mL de agua destilada a la cámara exterior del equipo Cash Still, esto se logra abriendo el paso en la válvula de tres vías.
3. Pipetear 10 mL de muestra a la cámara interior (agregar antiespumante).
4. Colocar la llave de paso en la posición de venteo, encender el mechero permitiendo que el agua ebulle en la cámara exterior.
5. Cuando el vapor salga libremente, colocar la llave de paso o válvula en la posición cerrado.
6. Destilar 125 mL en el erlenmeyer.
7. Adicionar al destilado 0,1 mL de fenolftaleína y titular rápidamente con NaOH 0,1 N.
8. Anotar el volumen gastado de NaOH 0,1 N como “n”.

La cantidad de ácido acético está dada por:

$$\frac{gCH_3COOH}{100 [mL]} = n * 0,006 * 4 \quad (38)$$

$$v. \quad \frac{g_{CH_3COOH}}{100 [mL]} = n * 0,006 * 4 \text{ **Determinación grados Brix**}$$

El índice de refracción a 20 °C, expresada ya sea como un valor absoluto o como un porcentaje en masa de sacarosa. Esto proporciona una forma de obtención de la concentración de azúcar en g/L.

Materiales:

Refractómetro

Procedimiento:

1. Llevar la muestra a una temperatura cercana a 20 °C y agitación constante.
2. Colocar una alícuota de la muestra en el prisma del refractómetro, teniendo en cuenta que la muestra cubra uniformemente toda la superficie del prisma.
3. Leer índice refractivo, y realizar al menos dos determinaciones de la muestra.

vi. Determinación de nitrógeno asimilable

Materiales:

Vaso precipitado de 100 mL

Soluciones estandarizadas

Probeta 100 mL

Potenciómetro

Procedimiento:

1. Calibrar el titulado automático (Titroline easy) con las soluciones buffer 4, 7 y 10.
2. Tomar una muestra de 3 mL y adiciona agua destilada hasta los 60 mL aproximadamente.
3. Introducir el electrodo en la muestra y agitar constantemente.
4. Ajustar el pH a 8.0.
5. Adicionar formalina al 37% y volver a titular hasta pH 8.0.
6. Anotar el volumen gastado.

El Nitrógeno asimilable se calcula según:

$$\text{Nitrogeno asimilable} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = (V_{\text{NaOH}} * [\text{NaOH}] * \left(\frac{25}{10} \right) * \left(\frac{1000}{10} \right) * 14 \quad (39)$$

$$\text{Nitrogeno asimilable} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = (V_{\text{NaOH}} * [\text{NaOH}] * \left(\frac{25}{10} \right) * \left(\frac{1000}{10} \right) * 14$$

vii. Determinación de SO_2

Material:

Equipo HANNA 84100 (Titulación automática)

Reactivos 84100-50/51/52/53/54

Agua destilada

Procedimiento:

Realizar calibración cada vez que se use el equipo.

SO_2 libre

1. Medir 50 mL de muestra, y mantener agitación constante.
2. Tomar 5 mL del reactivo ácido HI 84100-53 y adicionarlo a la muestra.
3. Añadir el estabilizador en polvo HI 84100-54 a la muestra.
4. Sumergir el electrodo en la solución.
5. Insertar la punta dosificadora dentro de la solución.
6. Iniciar la titulación (botón STAR STOP).

Durante la espera, en la pantalla del equipo mostrará el mensaje “titr” hasta que arroje la concentración de dióxido de azufre finalmente.

SO_2 Total

1. Medir 50 mL de muestra y mantener agitación constante.
2. Tomar 5 mL con el reactivo alcalino HI 84100-51 y adicionar el contenido a la muestra (esperar por 15 minutos).

3. Añadir 5 mL del reactivo ácido HI 84100-52 a la solución.
4. Adicionar el estabilizador en polvo HI 84100-54 a la muestra.
5. Sumergir el electrodo e insertar la punta dosificadora dentro de la solución.
6. Iniciar la titulación (botón STAR STOP).

Durante la espera, en la pantalla del equipo mostrará el mensaje “titr” hasta que arroje la concentración de dióxido de azufre finalmente.

viii. Determinación de células

Para el conteo de células totales y viables, se utiliza una cámara Neubauer para contar las levaduras. Esta cámara de conteo posee un cuadrado de 1 mm por lado, el cual está dividido en 25 cuadrados, y cada uno subdividido en 16 cuadrados más pequeños.

Células totales

El número de células a contar son dependientes de la concentración de la muestra. Para mayor precisión, la cámara deberá ser inoculada varias veces. Una convención es empleada para las células que quedan retenidas en la línea: Las células que tocan los bordes superiores o el lado derecho del cuadrado que se está viendo se incluyen en el conteo, mientras que las que están tocando los bordes inferiores e izquierdos son excluidos. Para las levaduras, cuando se desea el número unidades formadoras de colonias (cfu, colony forming units), células individuales o en gemación son contadas como una unidad sola. Este recuento representa la cantidad de células vivas y muertas. El método es aplicable a cualquier suspensión de partículas microscópica.

Materiales:

Cámara Neubauer

Microscopio óptico

Pipetas Pasteur

Procedimiento:

1. Colocar una gota de la suspensión celular en el cubreobjetos sobre la cámara Neubauer.

2. Contar las células presentes en varios cuadrados y sacar un promedio.

Sea N el promedio:

$$\frac{N^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} = N * 25 * 50 * 1000 \quad (40)$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} = N * 25 * 50 * 1000Si$$

Células viables (estimación aproximada)

Materiales:

Cámara Neubauer

Microscopio óptico

Pipetas Pasteur

Solución azul metileno

Procedimiento:

Para las levaduras, una buena indicación de la viabilidad del medio puede obtenerse microscópicamente. Para esto, se realiza una mezcla de aproximadamente de 1:1 de medio y de una solución de tinción de azul de metileno ($C_{16}H_{18}N_3SCI \cdot 3H_2O$) (1 g azul de metileno en 100 mL). La mezcla puede llevarse directamente al microscopio.

Las células viables no tomarán el color de la tinción, en cambio las células muertas darán una célula de color azul. La viabilidad celular en este caso es dependiente de la capacidad celular de fermentar, llevada en parte por la glicólisis. Este test debe hacerse en células frescas, no en muestras que han sido almacenadas.

Para este conteo se ocupa el mismo procedimiento que en células totales, con la única diferencia en la tinción de células muertas.

$$\frac{N^{\circ} \text{ células viables}}{\text{mL}} = N * 25 * 50 * 1000(\text{totales}) - N * 25 * 50 * 1000(\text{muertas}) \quad (41)$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ células viables}}{\text{mL}} = N * 25 * 50 * 1000(\text{totales}) - N * 25 * 50 * 1000(\text{muertas})$$

ix. Determinación azúcares reductores

Puede hacerse por varios métodos. Muchas veces se estima como la suma de la glucosa más la fructosa. Los métodos clásicos son Fehling, DNS y por kit enzimáticos.

Método de Fehling

Cuantifica el contenido de azúcares reductores. Los azúcares reductores tienen la propiedad de reducir en caliente y en medio alcalino el sulfato de cobre de color azul a óxido cuproso que da un precipitado de color rojo ladrillo. El método se aplica a mostos o vino que contienen menos de 5 g/L de azúcares reductores. Con una concentración más elevada hay riesgo que el azúcar se caramelicé al comienzo de la determinación.

Material:

Pipetas de 5 mL

Matraz de 100 mL

Bureta de Mohr

Mechero

Reactivos de Fehling A y B.

Procedimiento:

1. Clarificar la muestra con carbón activado.
2. Llenar la bureta de Mohr con la muestra.
3. Tomar exactamente 5 mL de las soluciones de Fehling A y B respectivamente e introducirlos en el matraz.
4. Añadir a esta mezcla 20 mL aproximadamente de agua destilada.
5. Llevar a ebullición el contenido del matraz agitando vigorosamente.
6. Añadir lentamente la muestra sobre el líquido del matraz mantenido en ebullición y sin parar de agitar. La determinación debe hacerse lo más rápido posible.

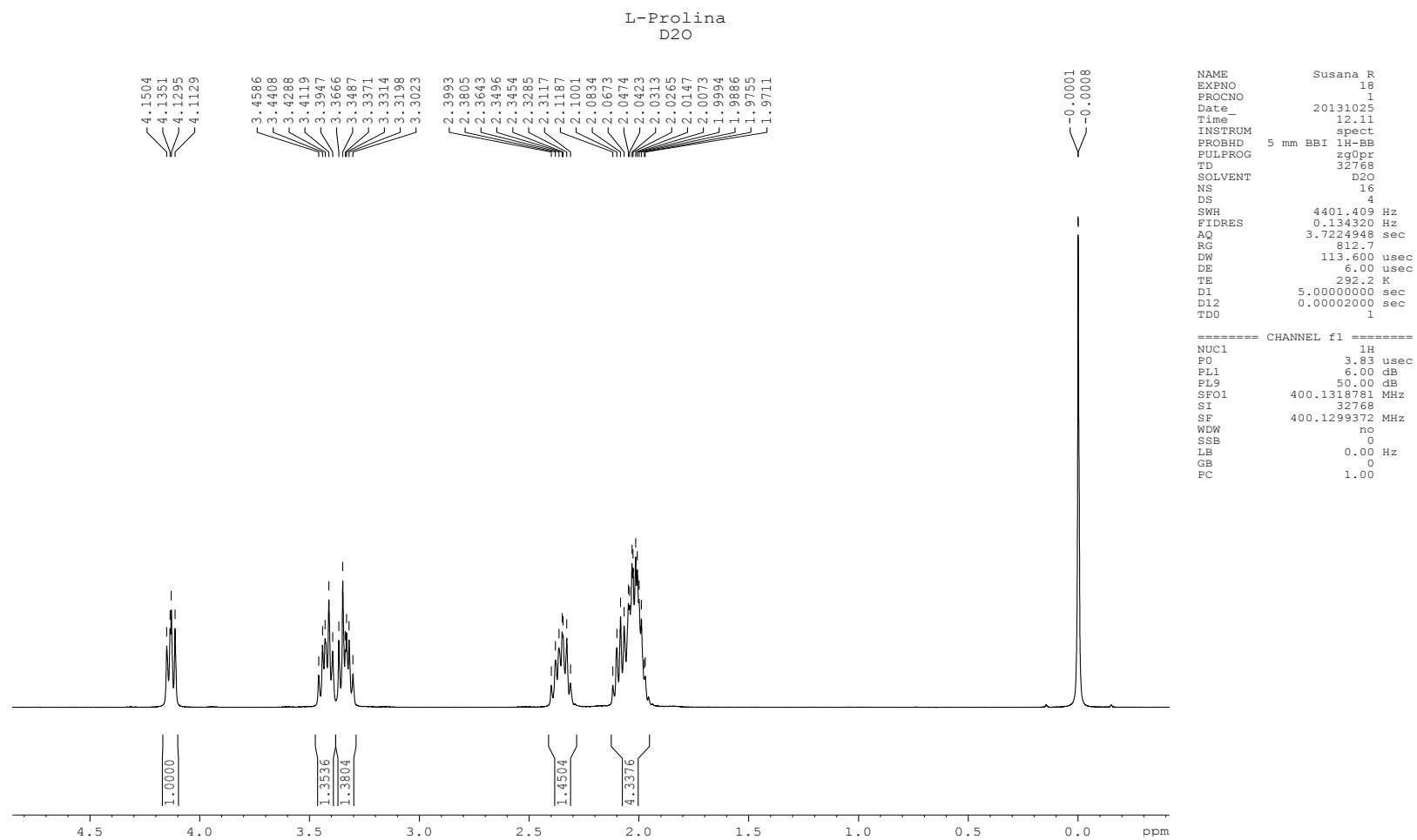
7. Observar un precipitado de color rojo o ladrillo, el líquido sobrenadante es azul. Cuando se vuelve incoloro, la determinación ha terminado.

Se leen los mL o “n” gastados de muestra.

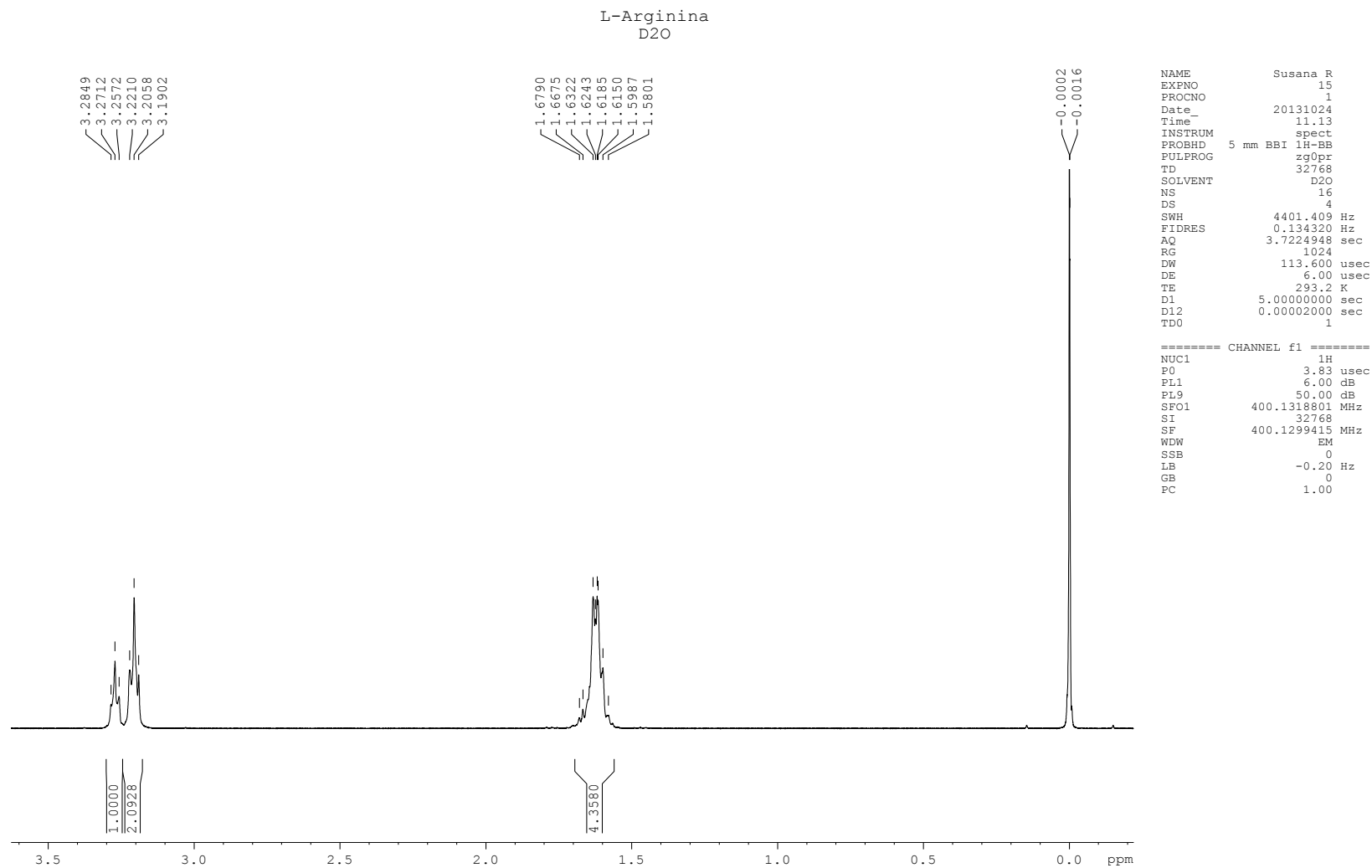
$$\frac{g \text{ azúcares}}{L} = \frac{25}{n} \quad (41)$$

$$\frac{g \text{ azúcares}}{L} = \frac{25}{n}$$

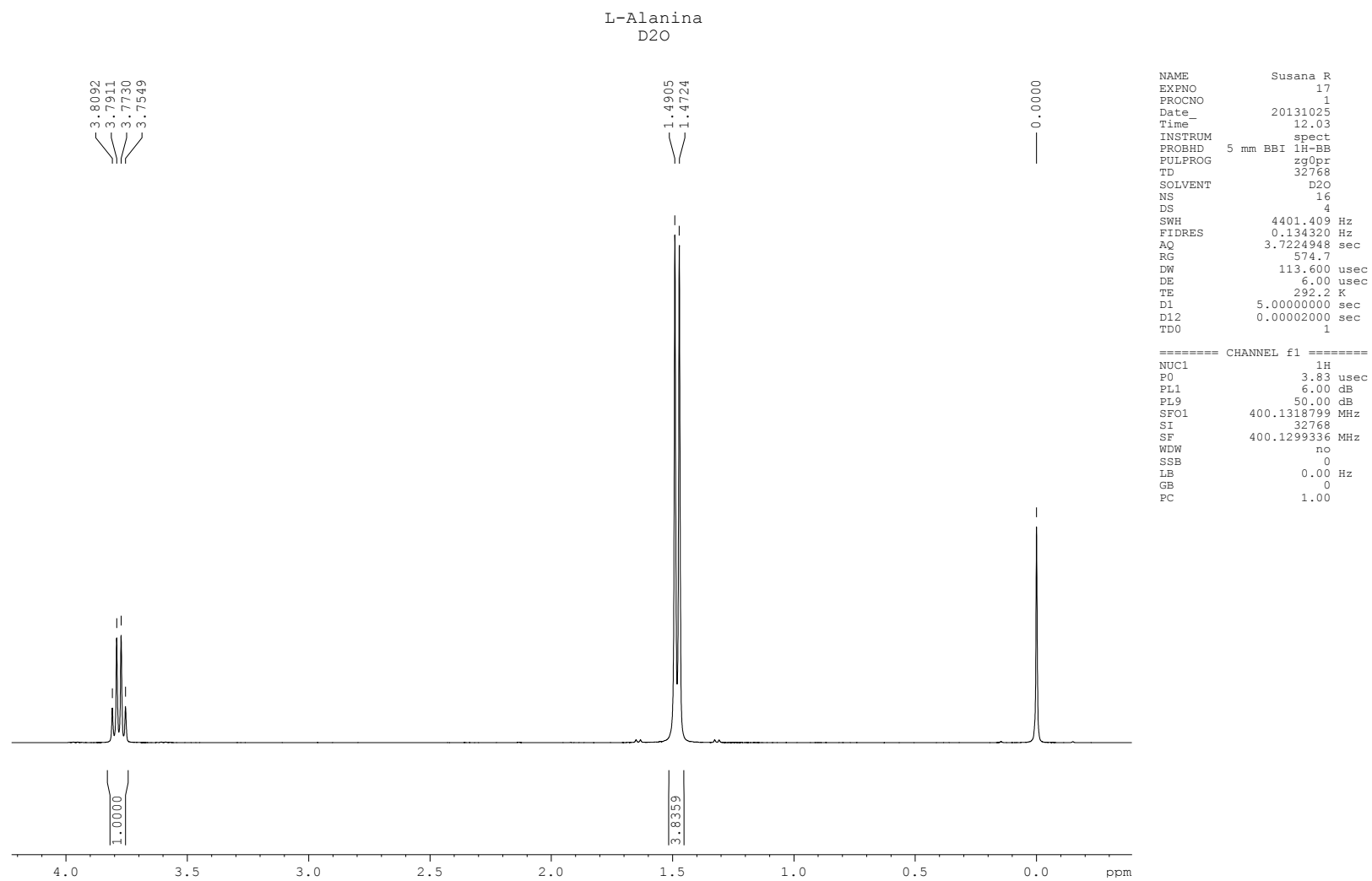
Anexo 2. Espectros de ^1H RMN, elucidación estructural de estándares de aminoácidos.



Espectro de ^1H RMN del estándar de prolina.

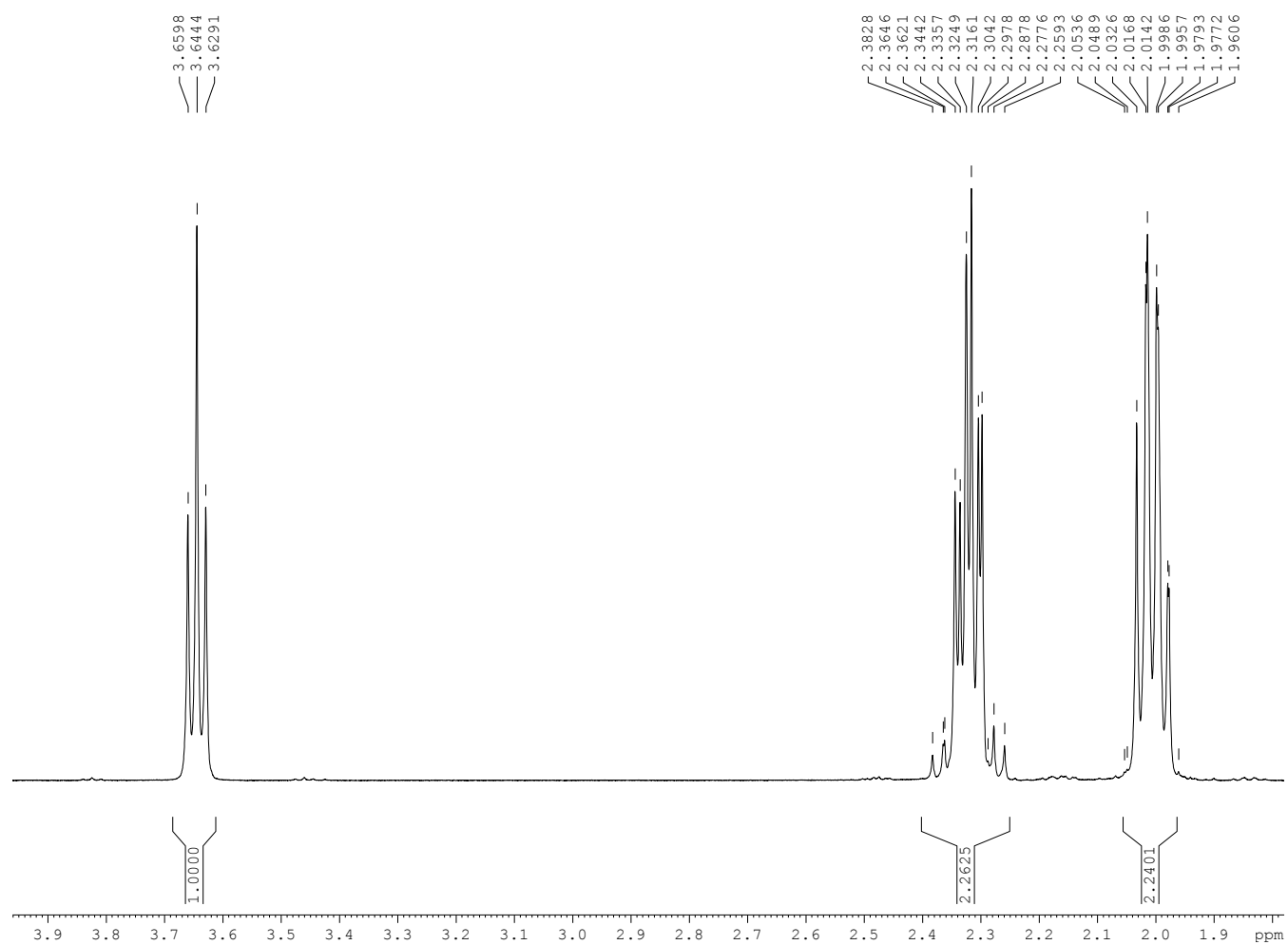


Espectro de ^1H RMN del estándar de arginina.



Espectro de ¹H RMN del estándar de alanina.

Glutamina
D2O

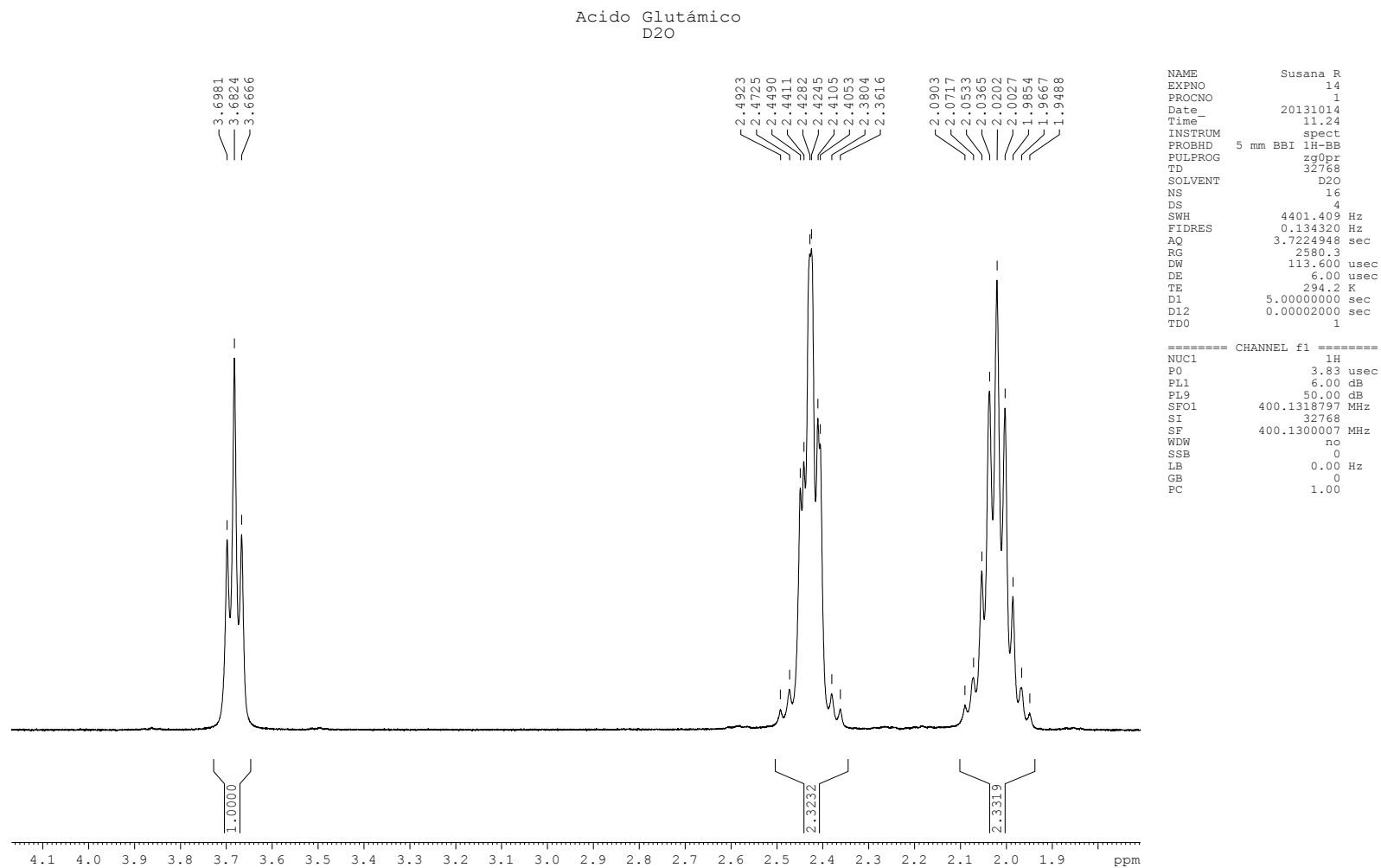


```

NAME          Susana R
EXPNO         13
PROCNO        1
Date_         20131014
Time         11.03
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm BBI 1H-BB
PULPROG       zg0pr
TD            32768
SOLVENT       D2O
NS            16
DS            4
SWH           4401.409 Hz
FIDRES        0.134320 Hz
AQ            3.7224948 sec
RG            1149.4
DW            113.600 usec
DE            6.00 usec
TE            293.2 K
D1            5.00000000 sec
D12           0.00002000 sec
TD0           1

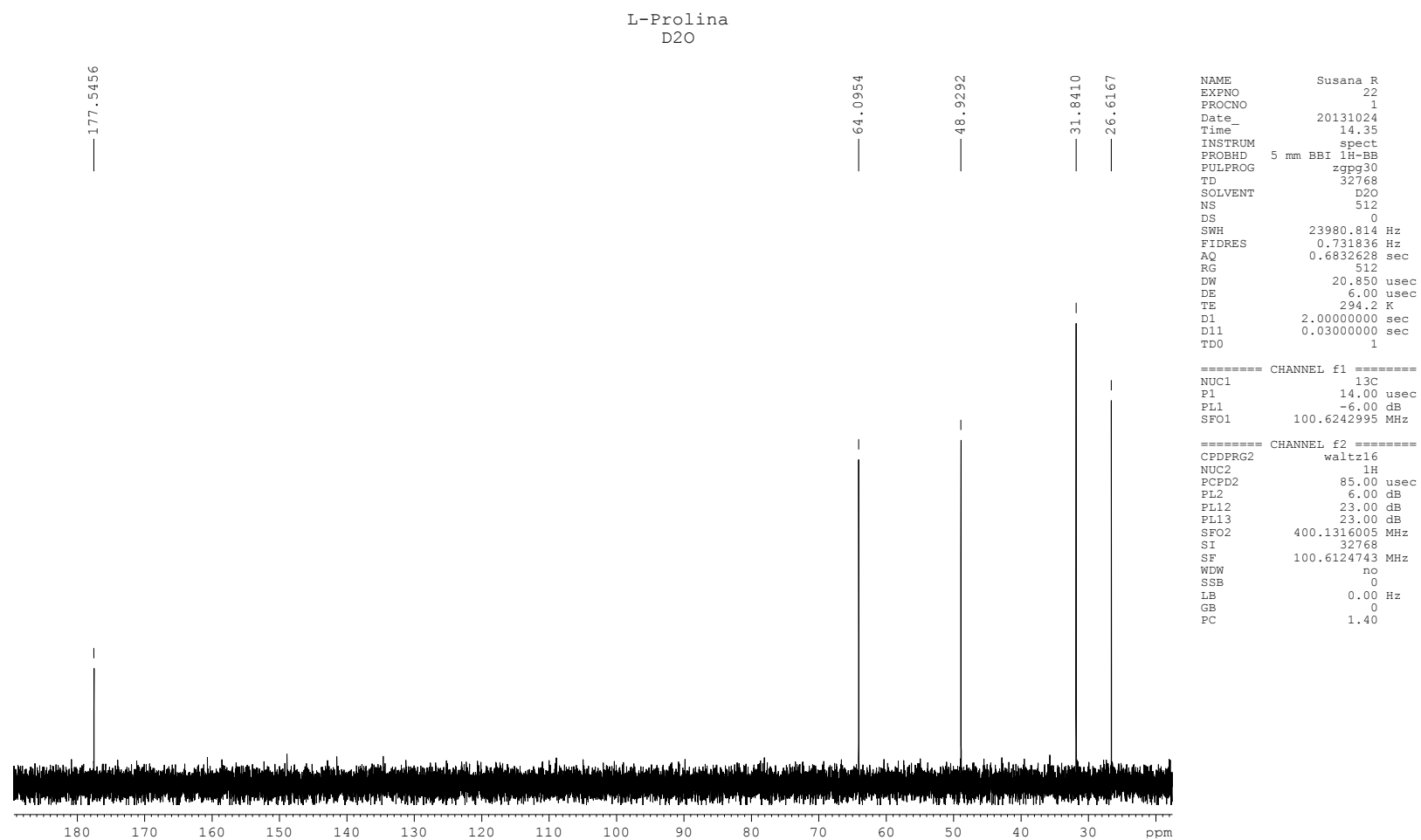
===== CHANNEL f1 =====
NUC1          1H
P0            3.83 usec
PL1           6.00 dB
PL9           50.00 dB
SFO1          400.1318795 MHz
SI            32768
SF            400.1300007 MHz
WDM           no
SSB           0
LB            0.00 Hz
GB            0
PC            1.00
    
```

Espectro de ¹H RMN del estándar de glutamina.

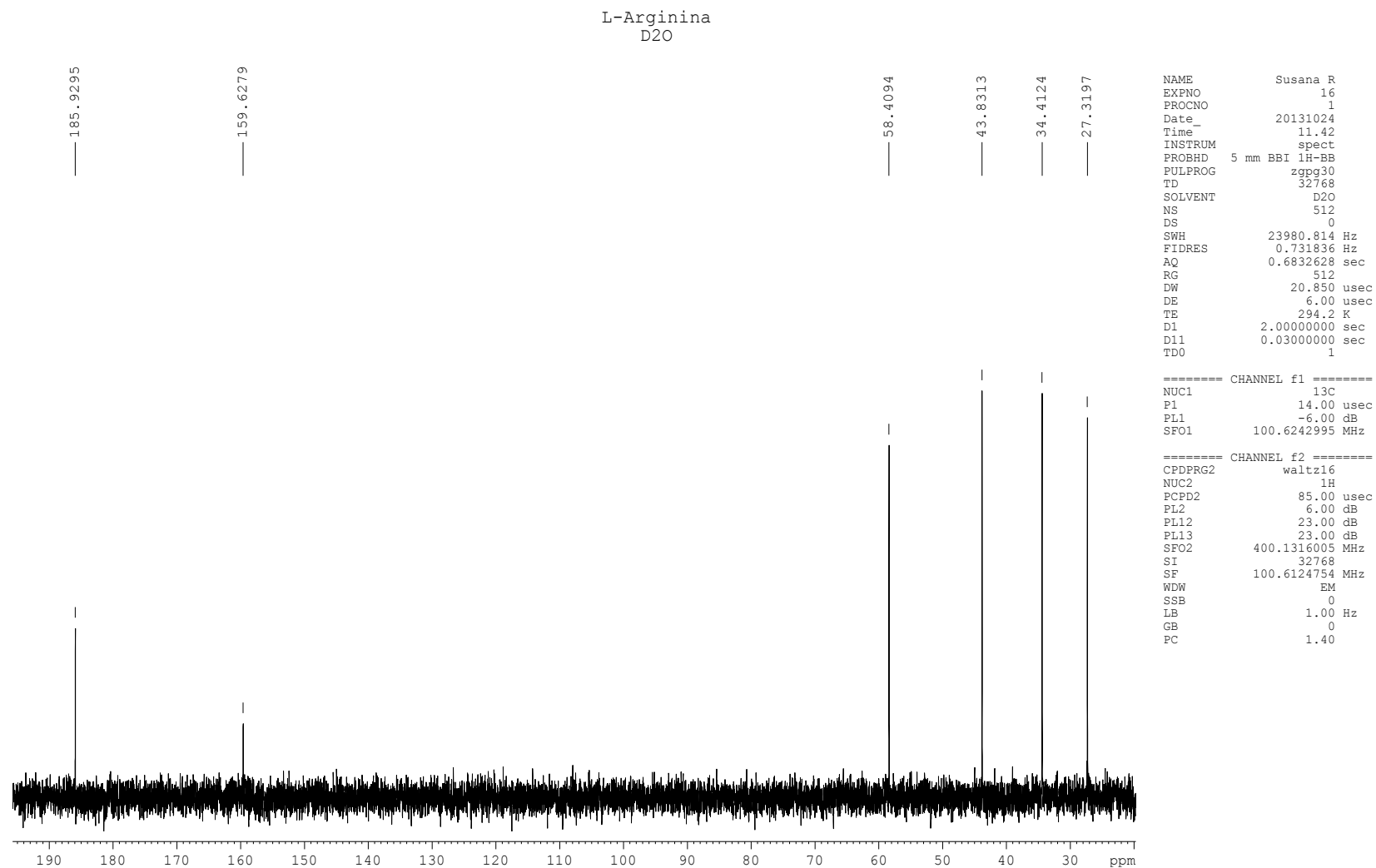


Espectro de ¹H RMN del estándar de ácido glutámico.

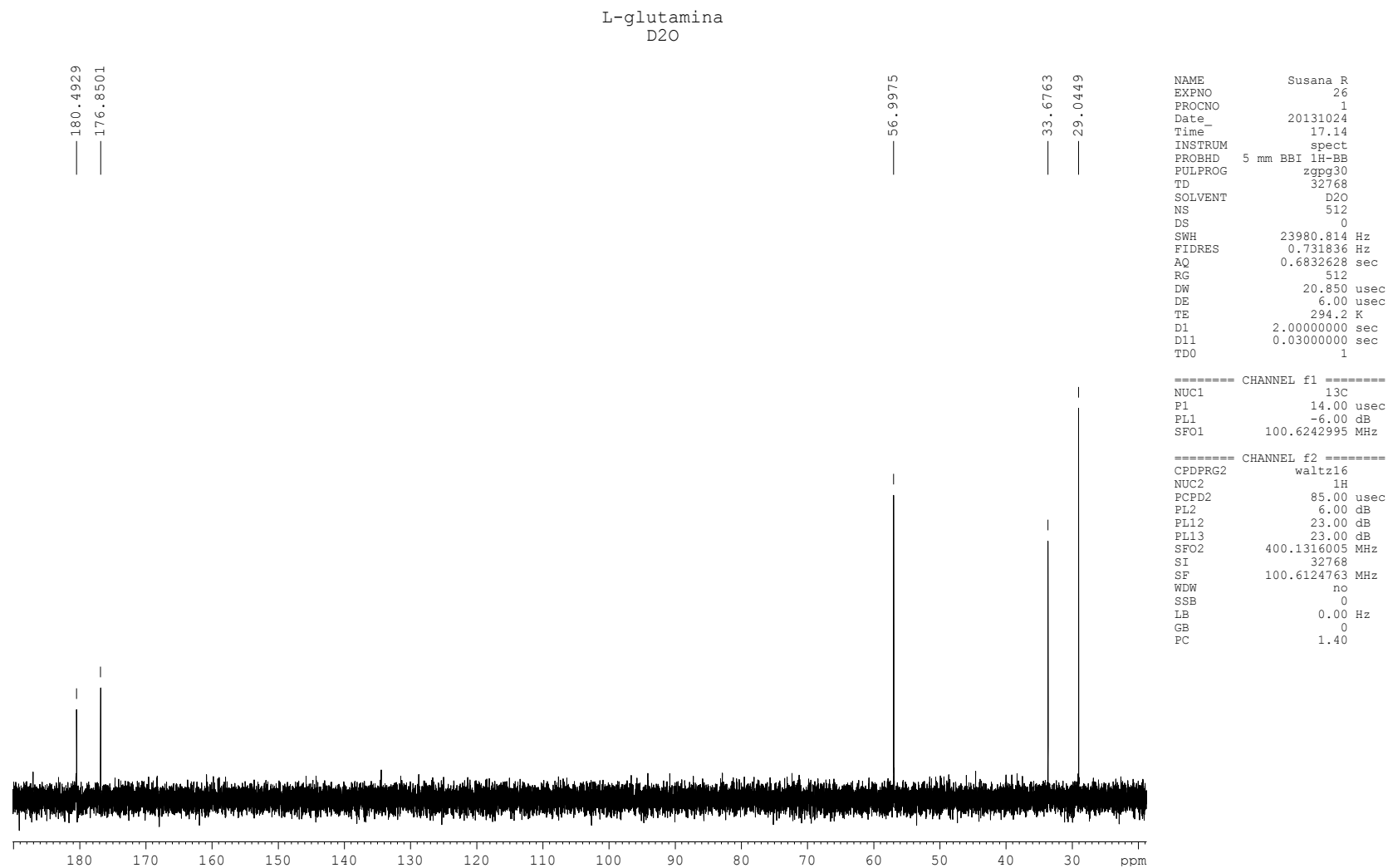
Anexo 3. Espectros de ^{13}C RMN, elucidación estructural de estándares de aminoácidos.



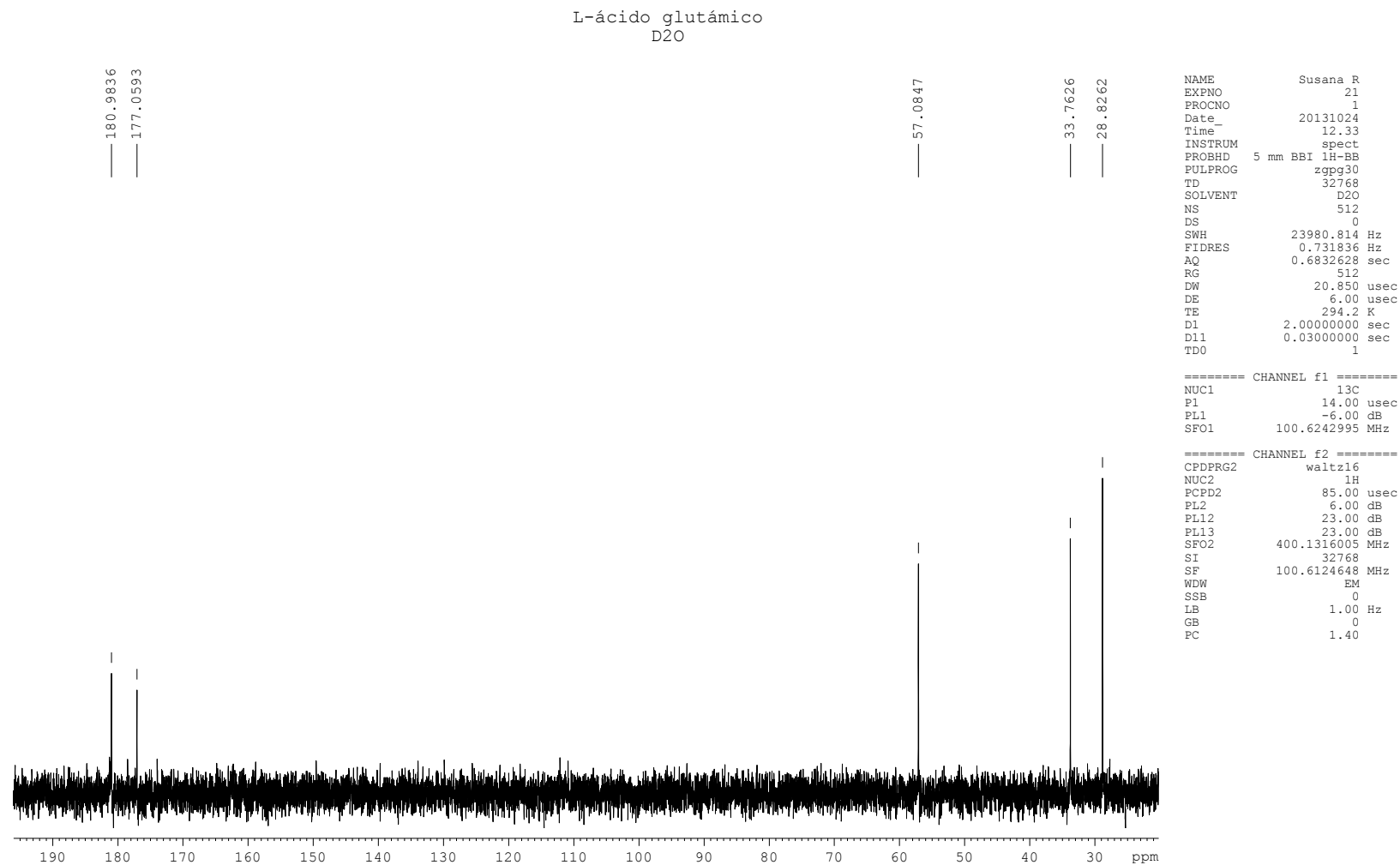
Espectro de ^{13}C RMN del estándar de prolina.



Espectro de ^{13}C RMN del estándar de arginina.

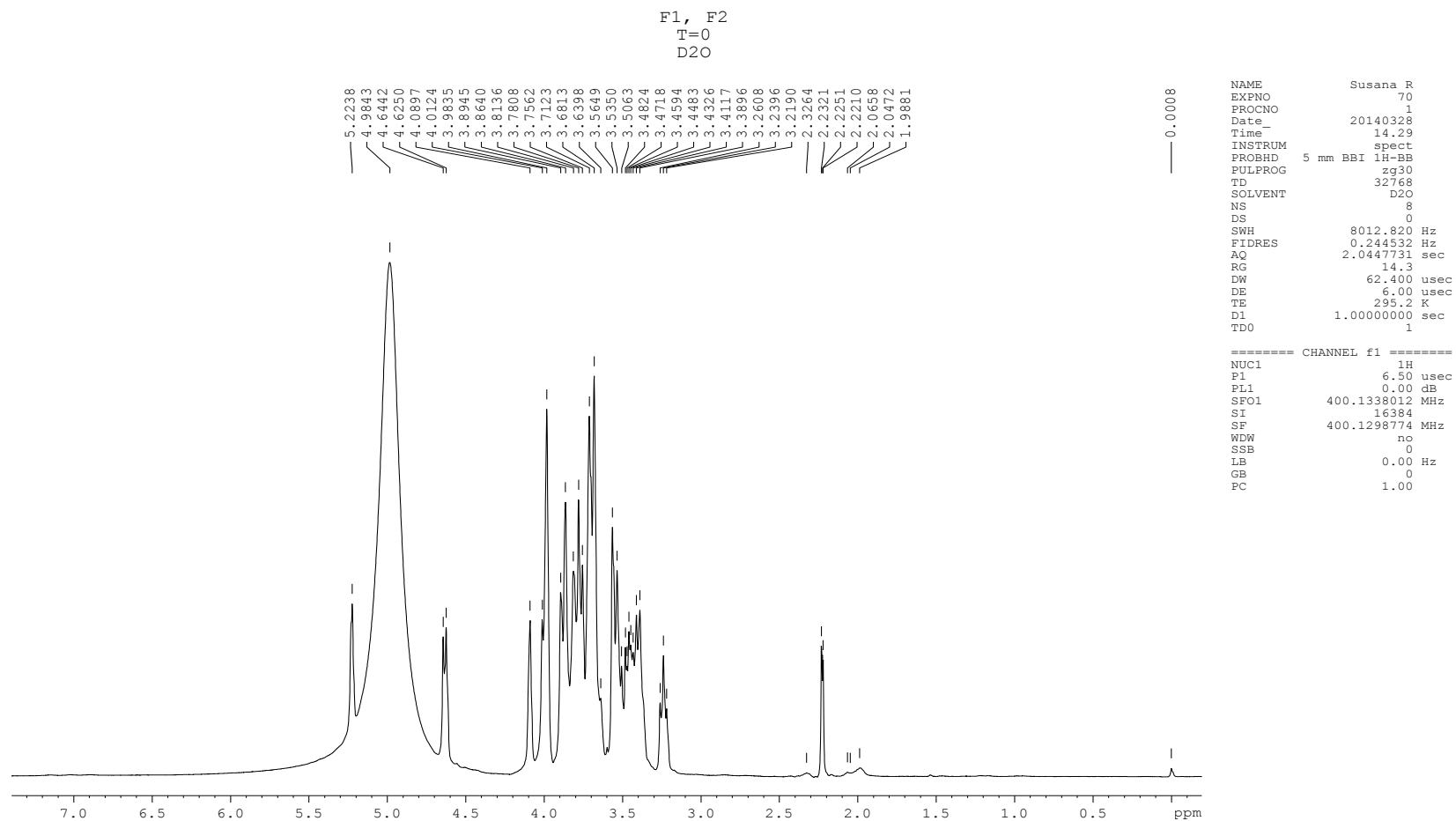


Espectro de ¹³C RMN del estándar de glutamina.

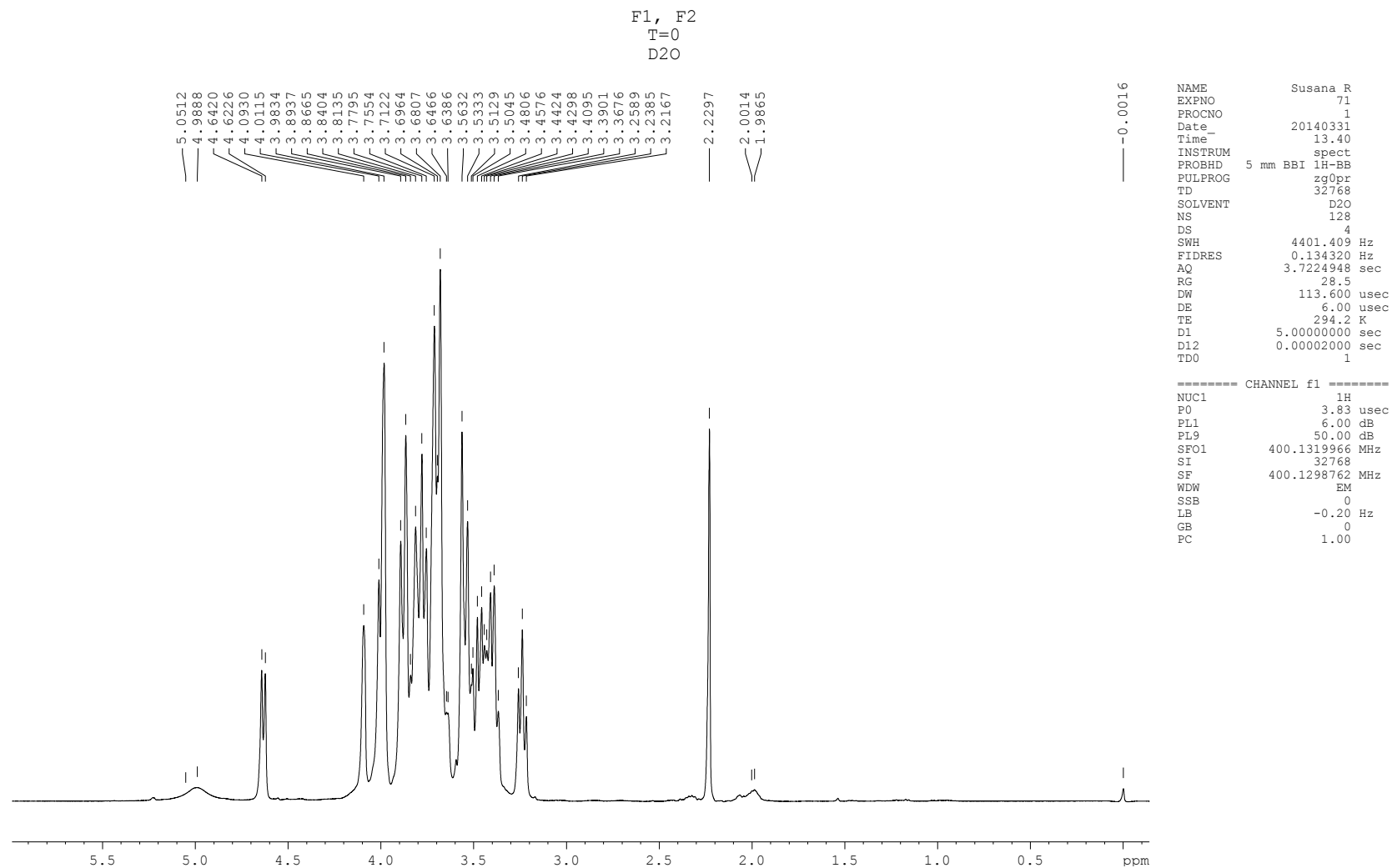


Espectro de ^{13}C RMN del estándar de ácido glutámico.

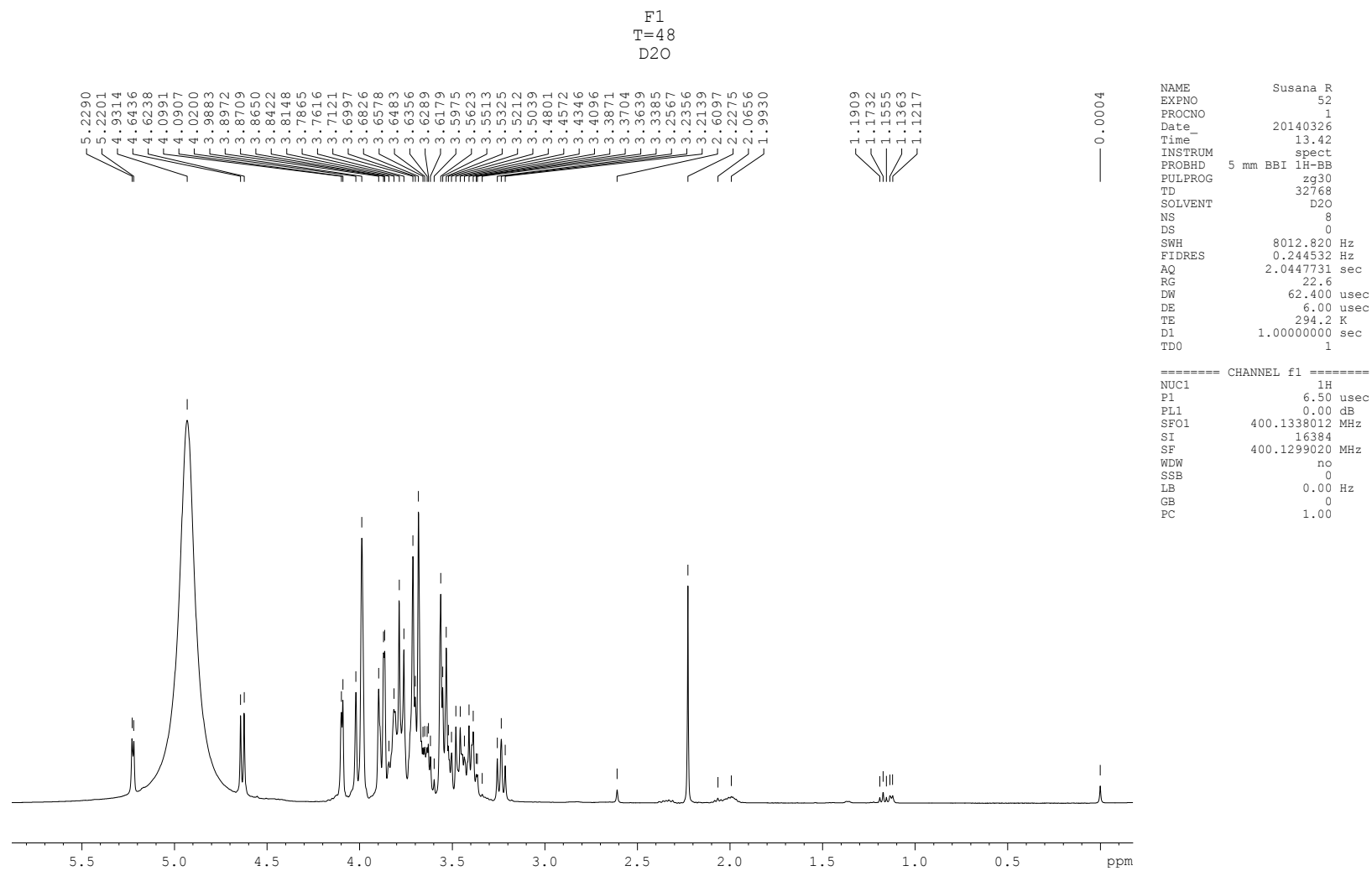
Anexo 4. Espectros de ^1H RMN (con y sin supresión de disolvente) y espectros de ^{13}C RMN de mostos en fermentación (cepa *Carménère*).



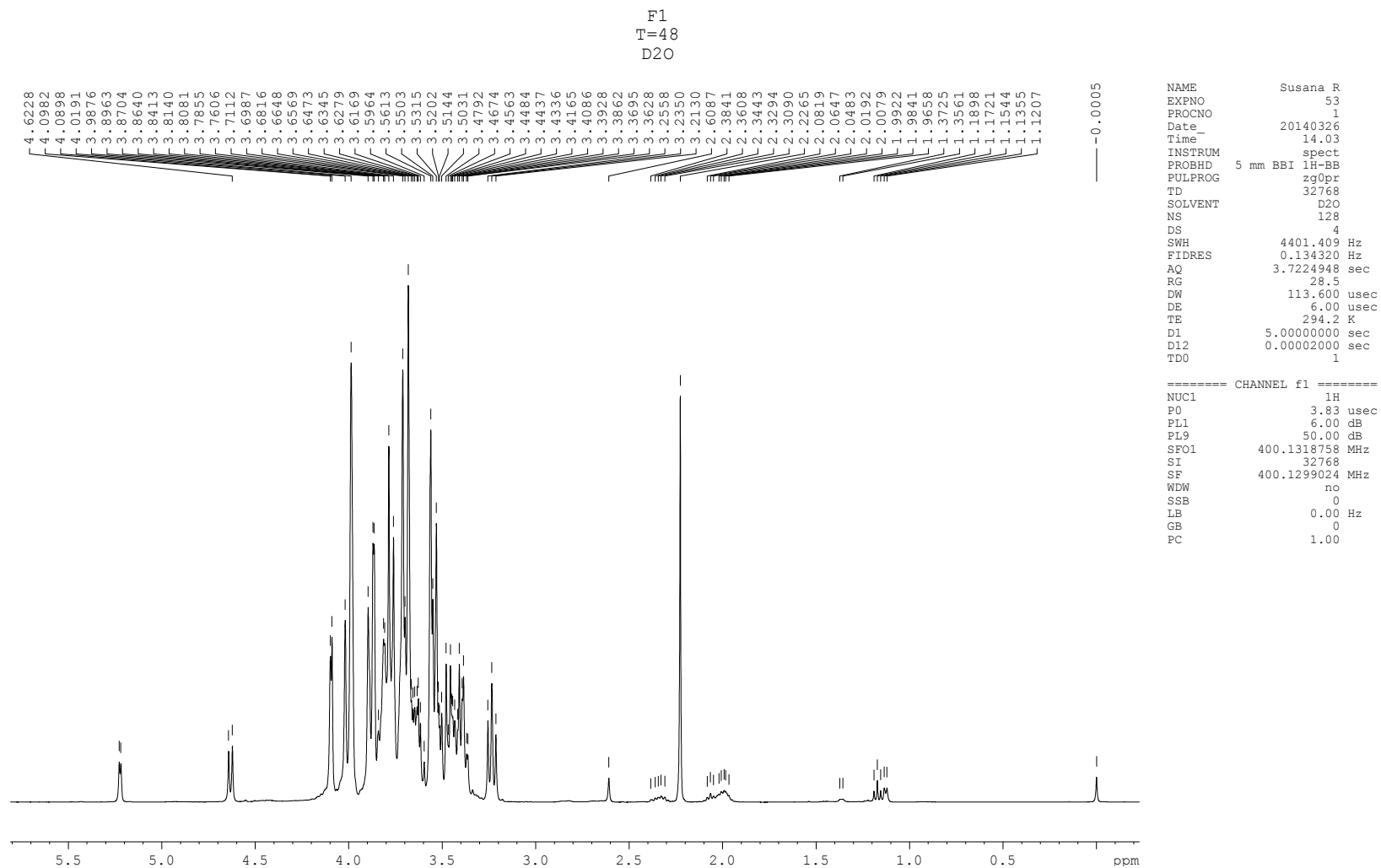
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F1 y F2 a $t=0$ h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



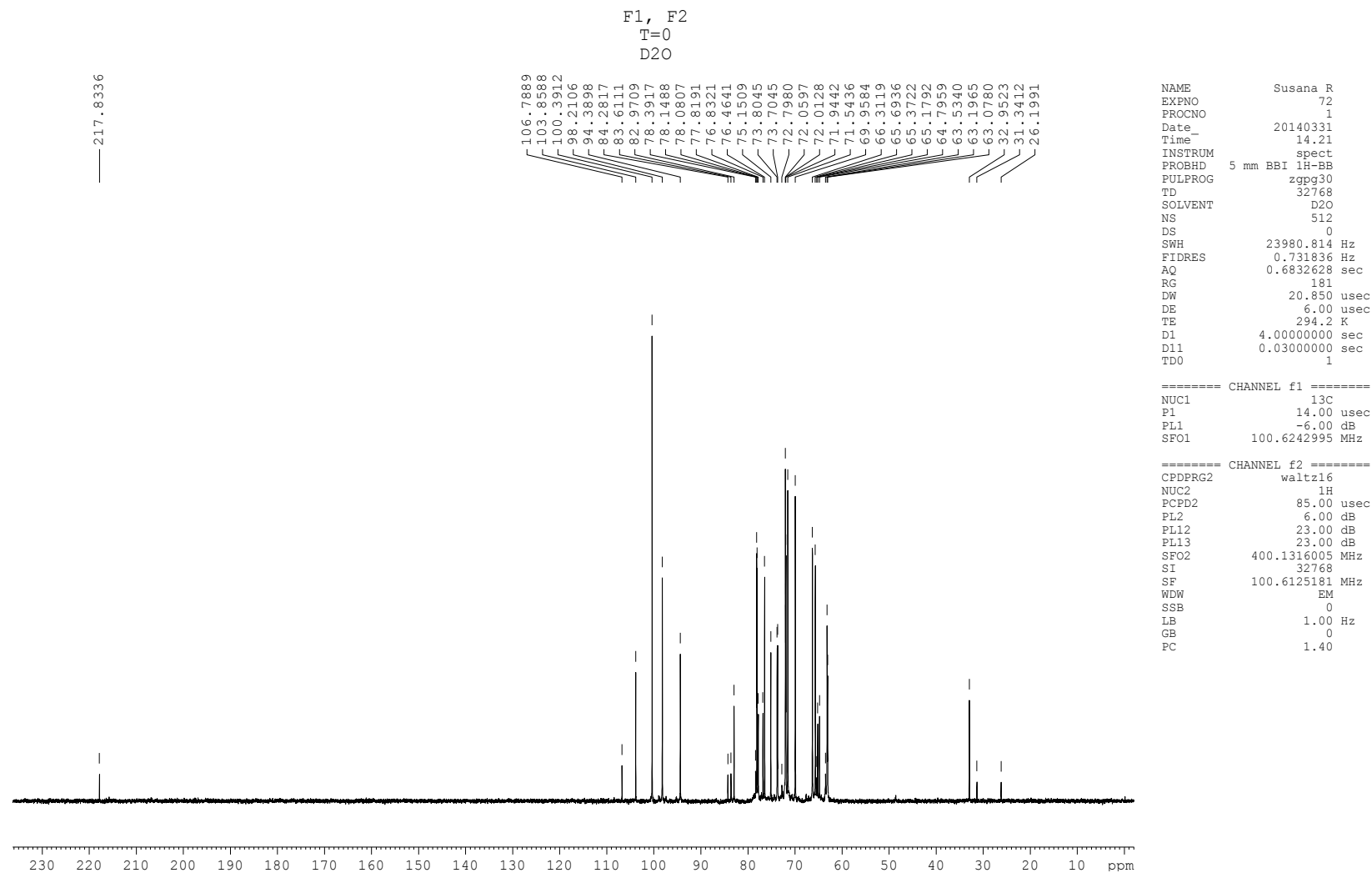
Espectro de ¹H RMN de la fermentación F1 y F2 a t=0 h. Con supresión de disolvente. Con TSP.



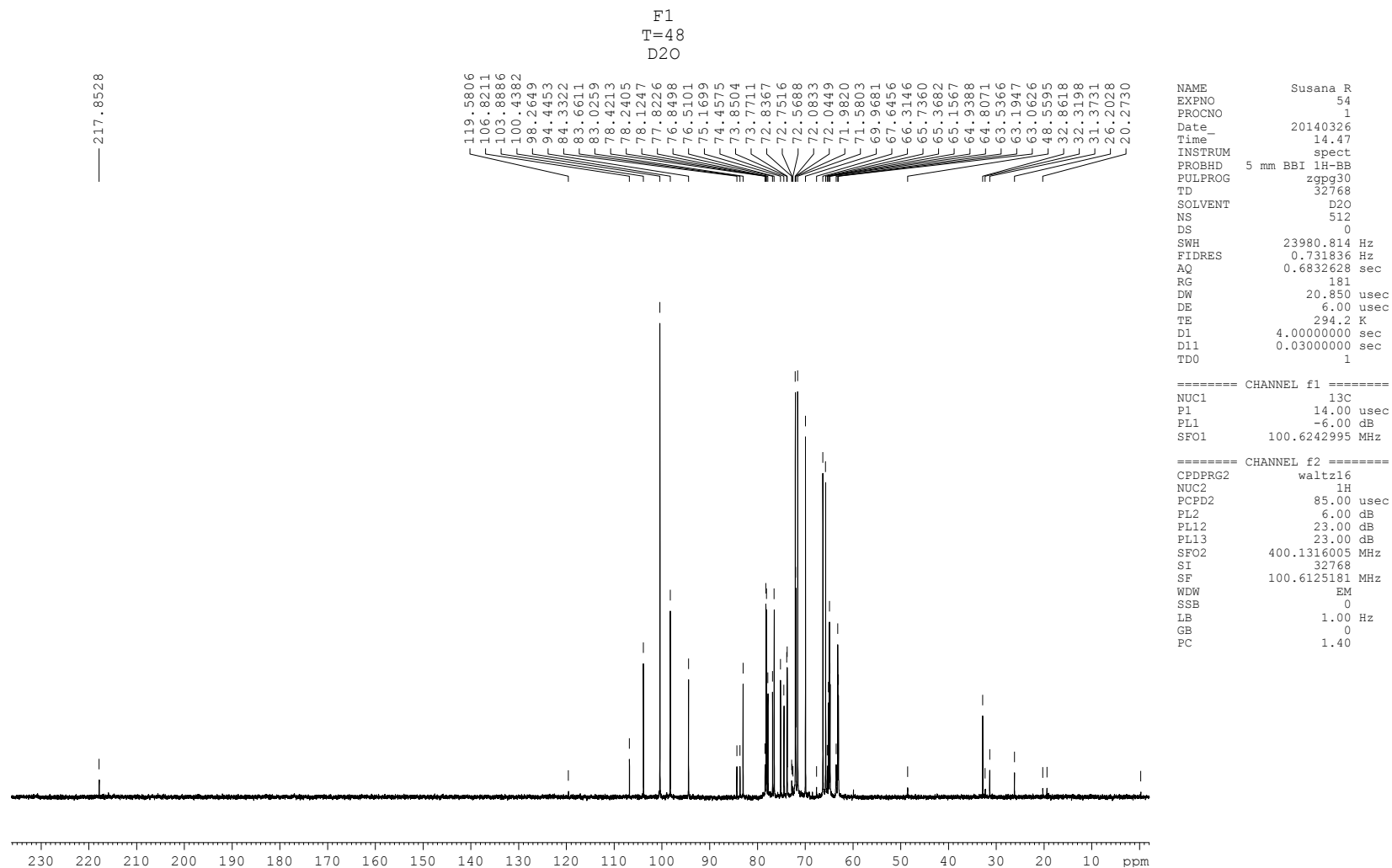
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F1 a $t=48$ h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



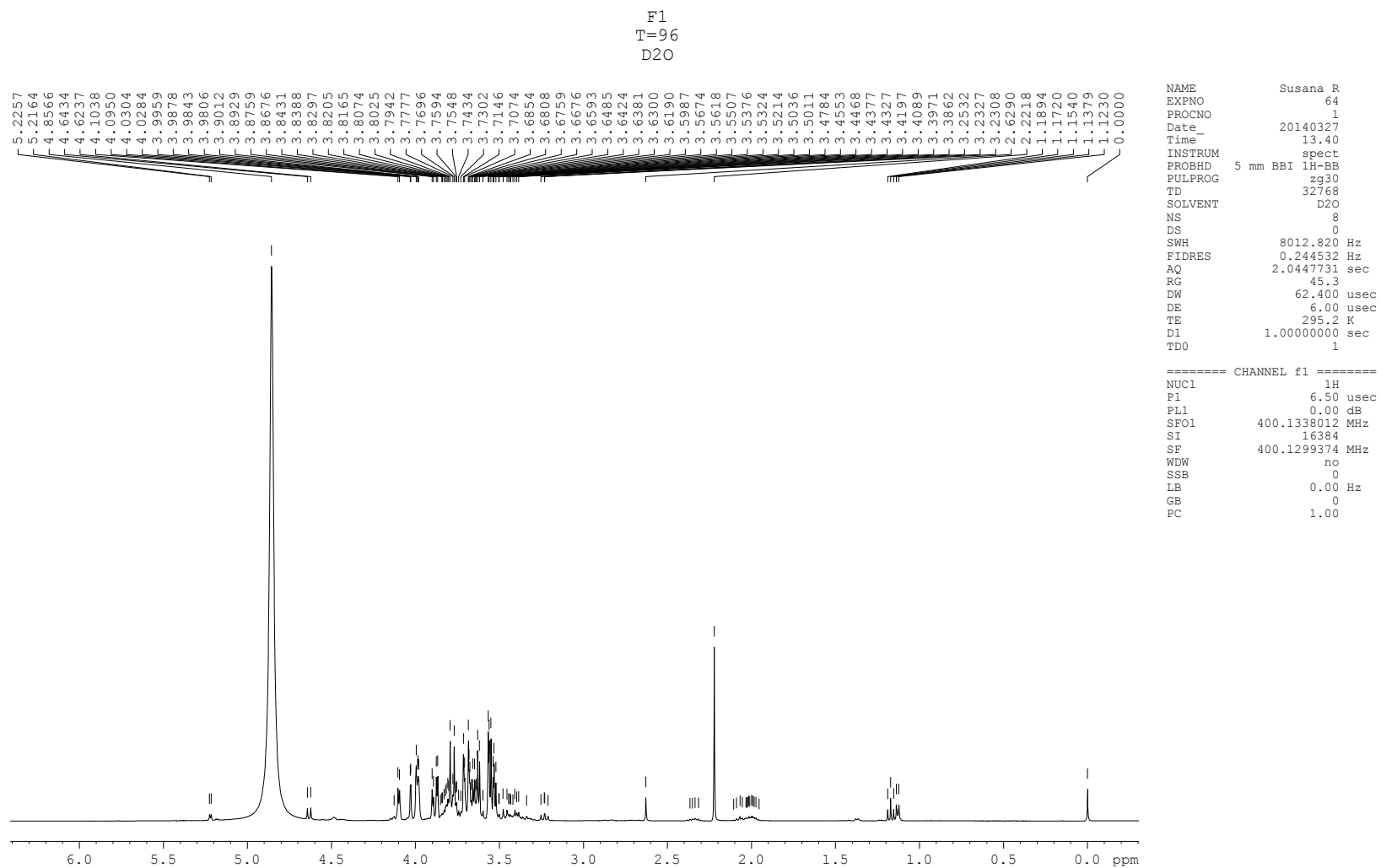
Espectro de ¹H RMN de la fermentación F1 y F2 a t=0 h. Con supresión de disolvente. Con TSP.



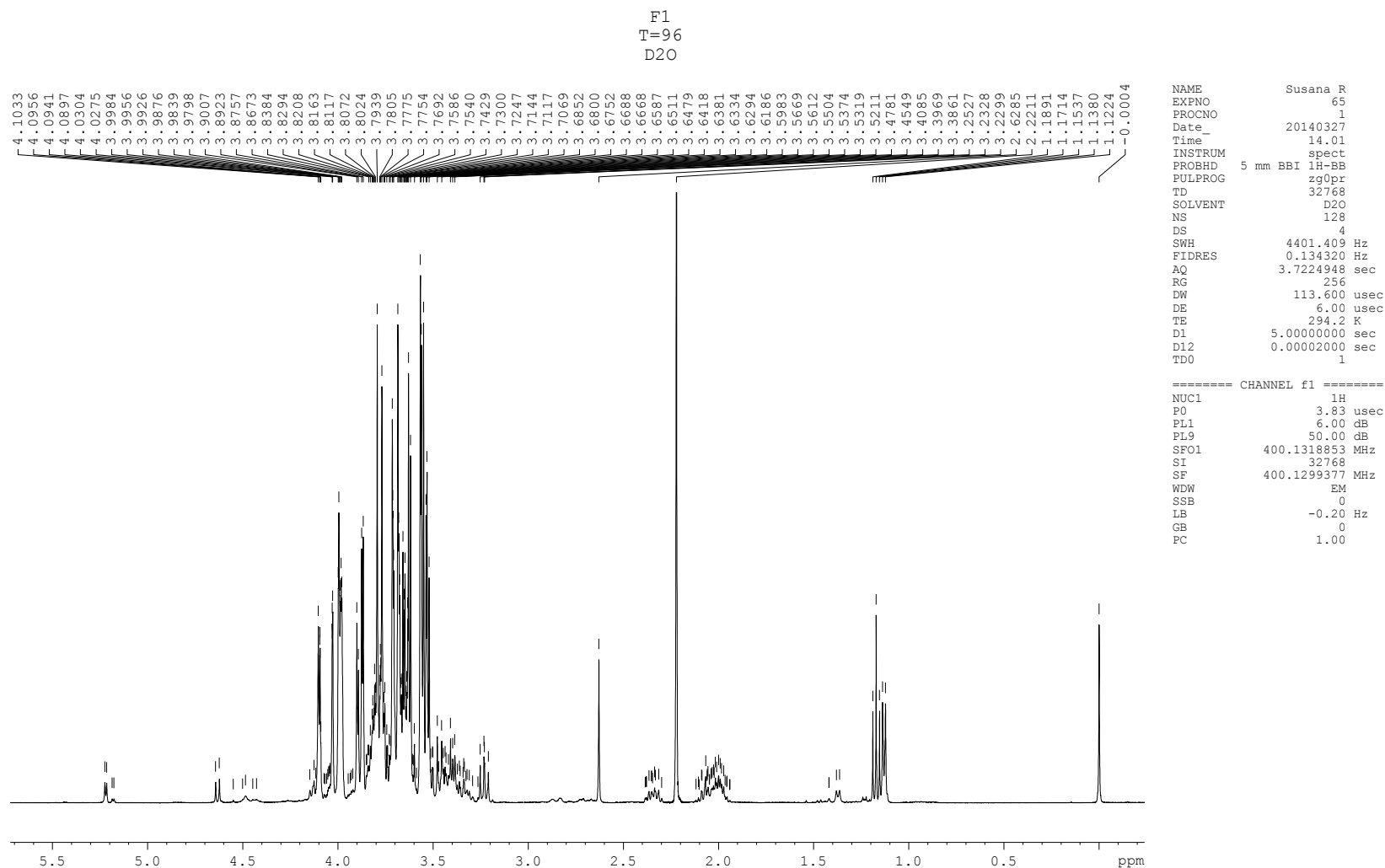
Espectro de ¹³C RMN de la fermentación F1 y F2 a t=0 h. Con TSP.



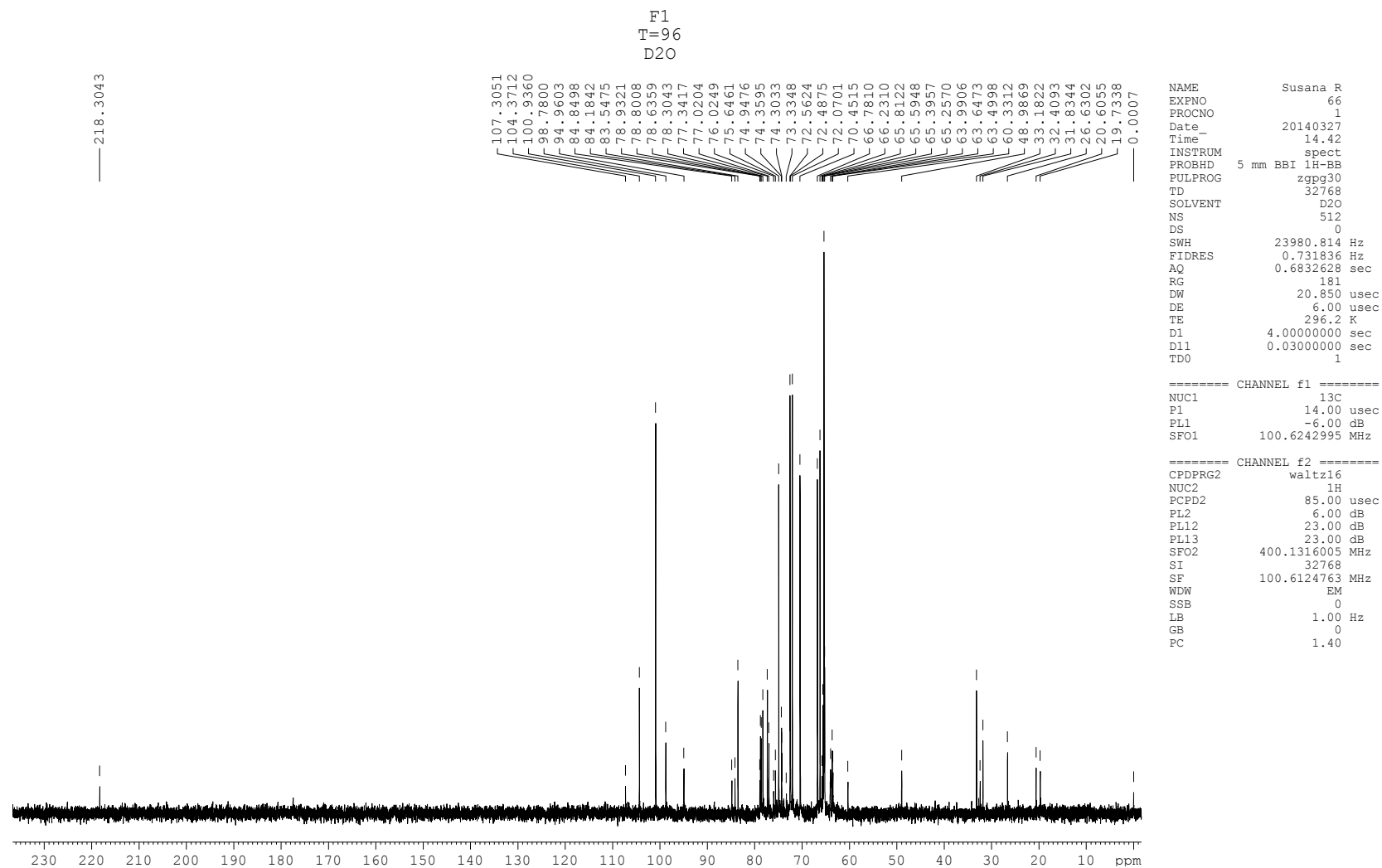
Espectro de ¹³C RMN de la fermentación F1 a t=48 h. Con TSP.



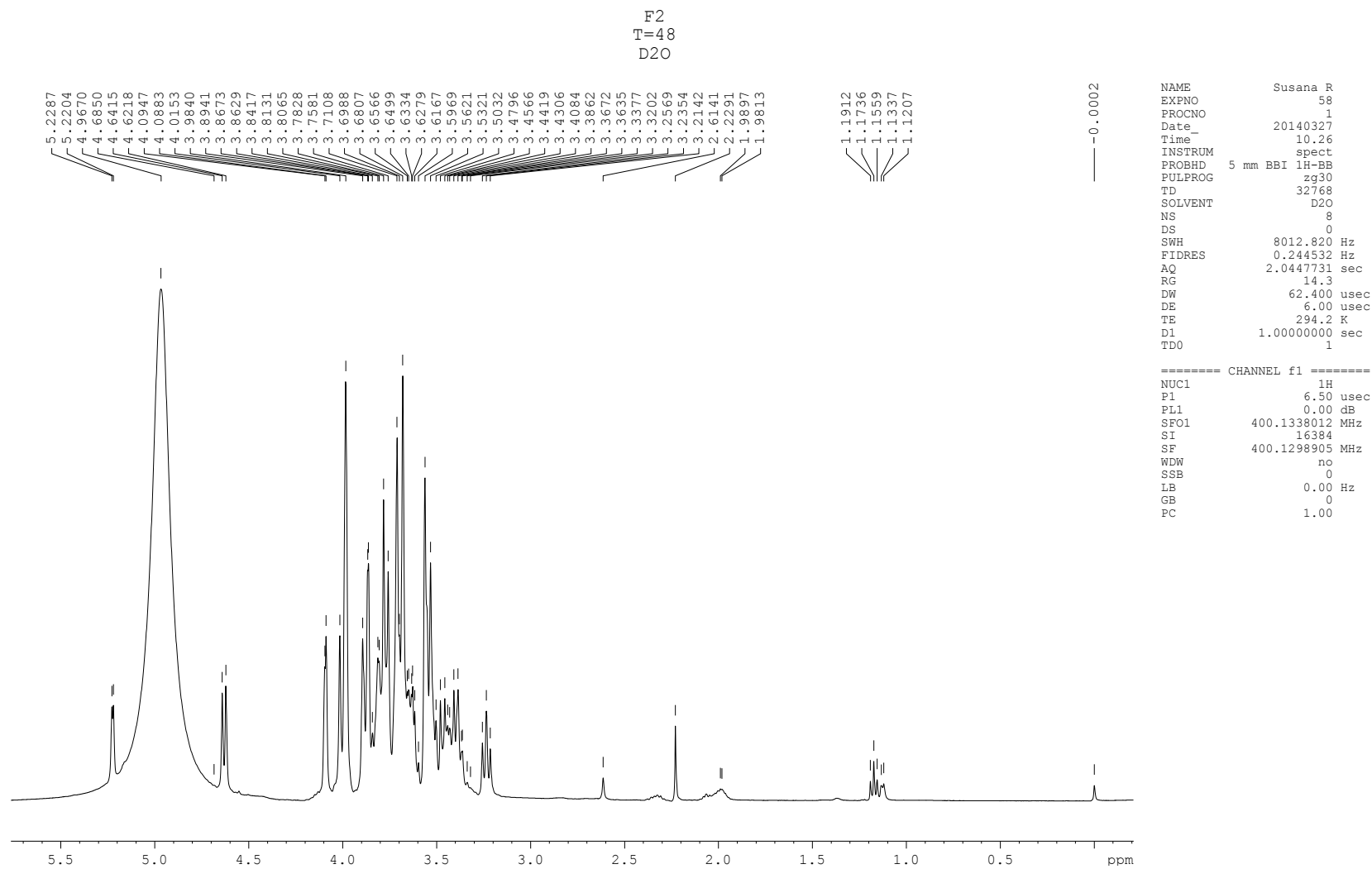
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F1 a $t=96$ h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



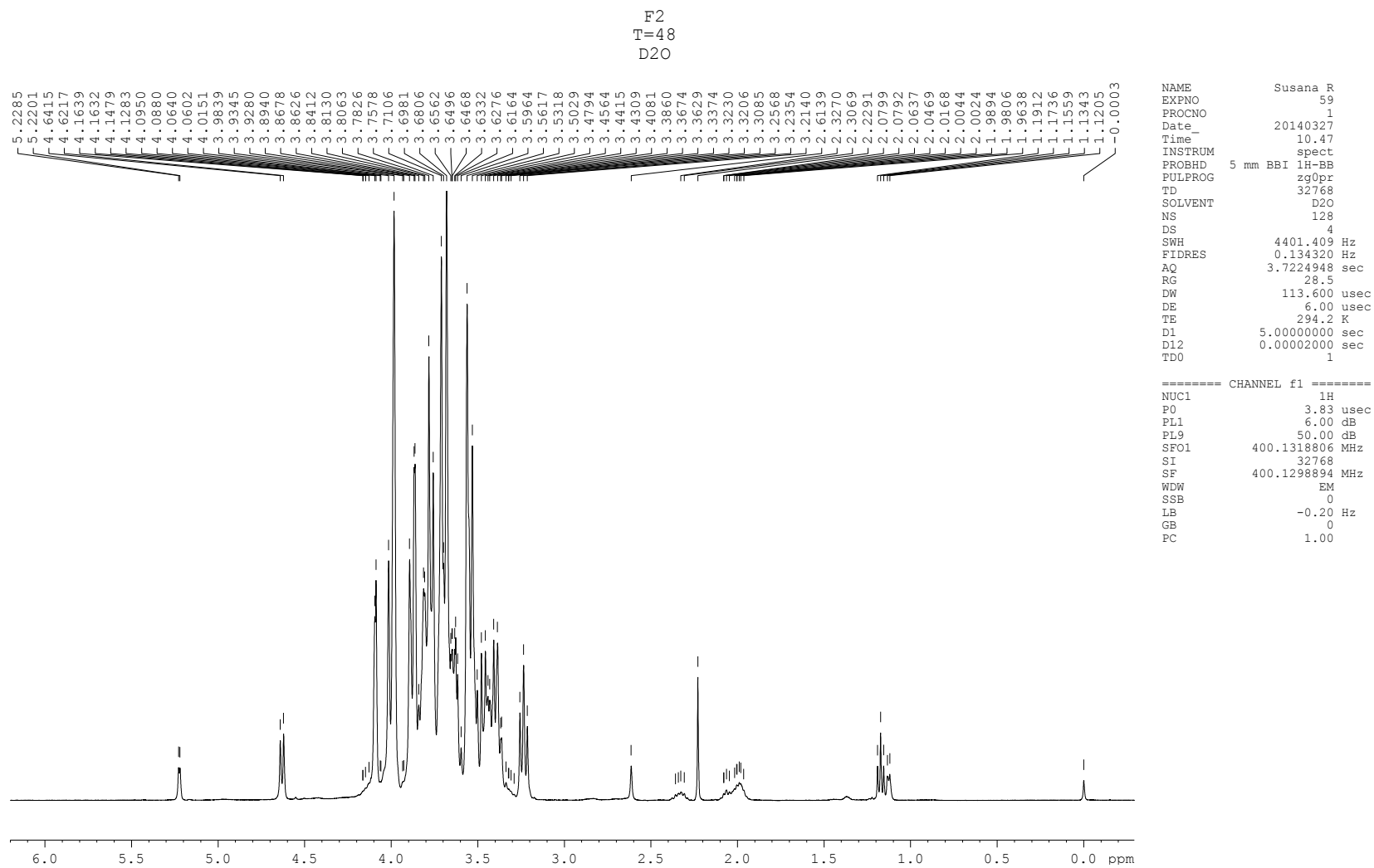
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F1 a $t=96$ h. Con supresión de disolvente. Con TSP.



Espectro de ¹³C RMN de la fermentación F1 a t=96 h. Con TSP.

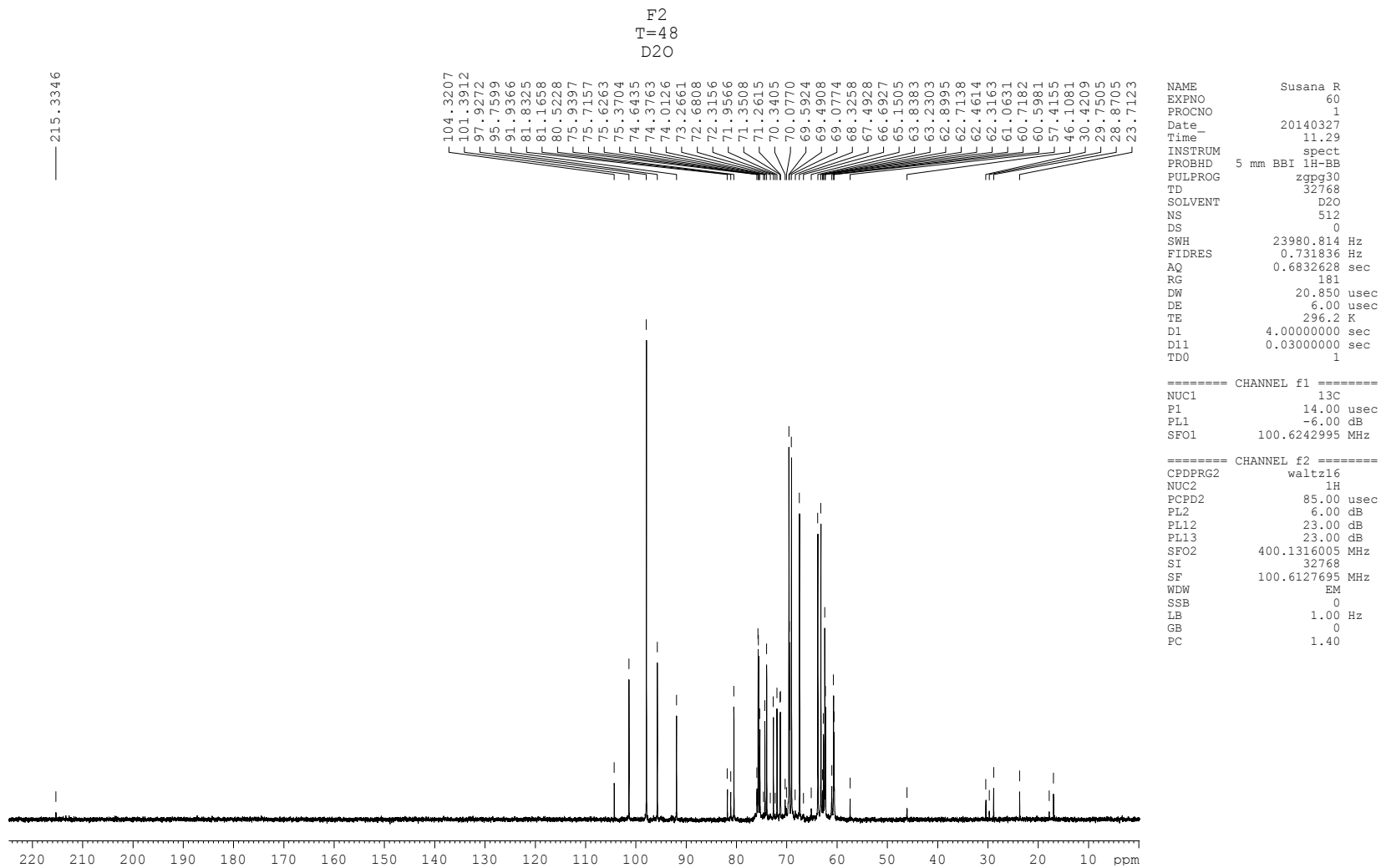


Espectro de ¹H RMN de la fermentación F2 a t=48 h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.

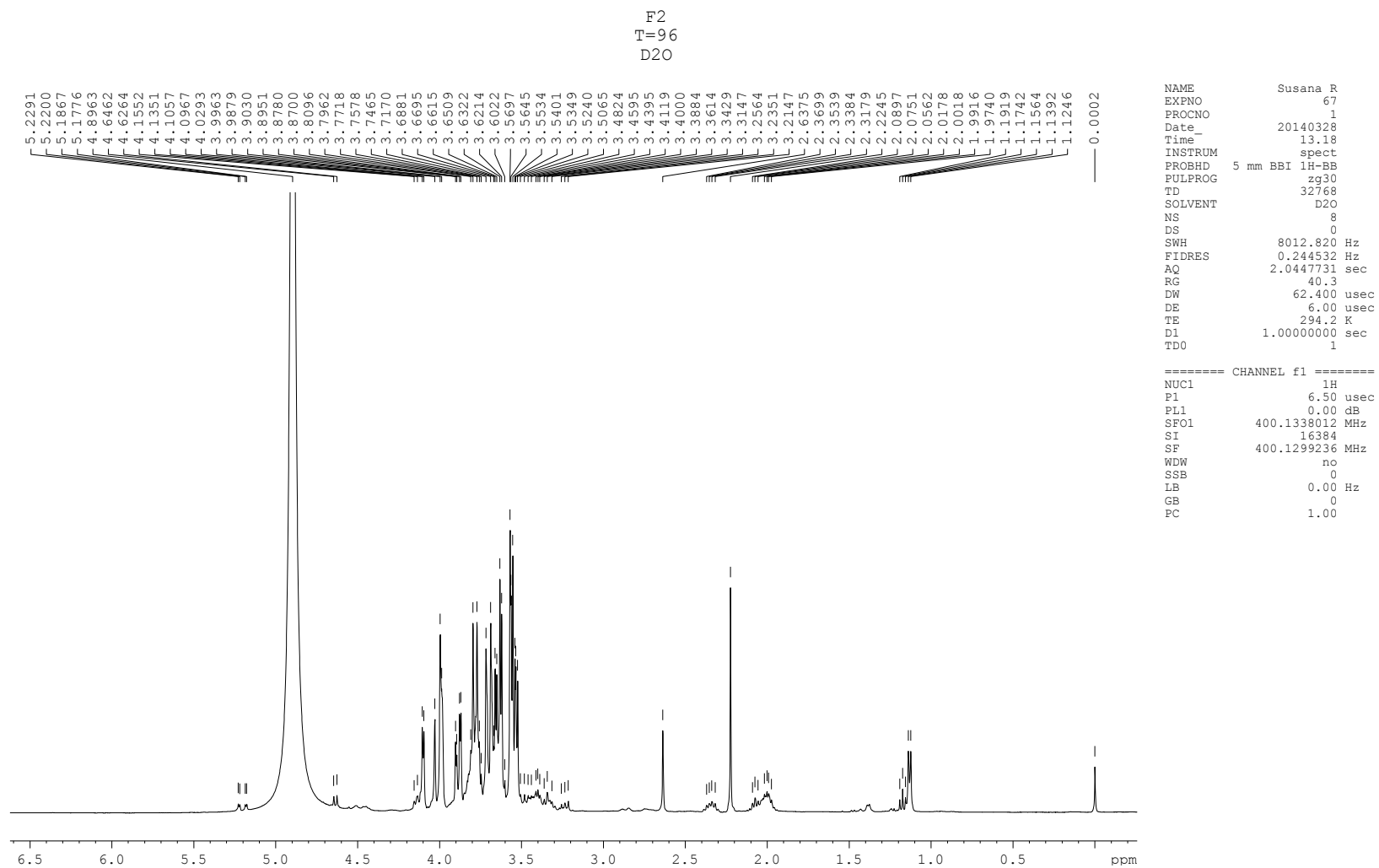


Espectro de ¹H RMN de la fermentación F2 a t=48 h. Con supresión de disolvente. Con TSP.

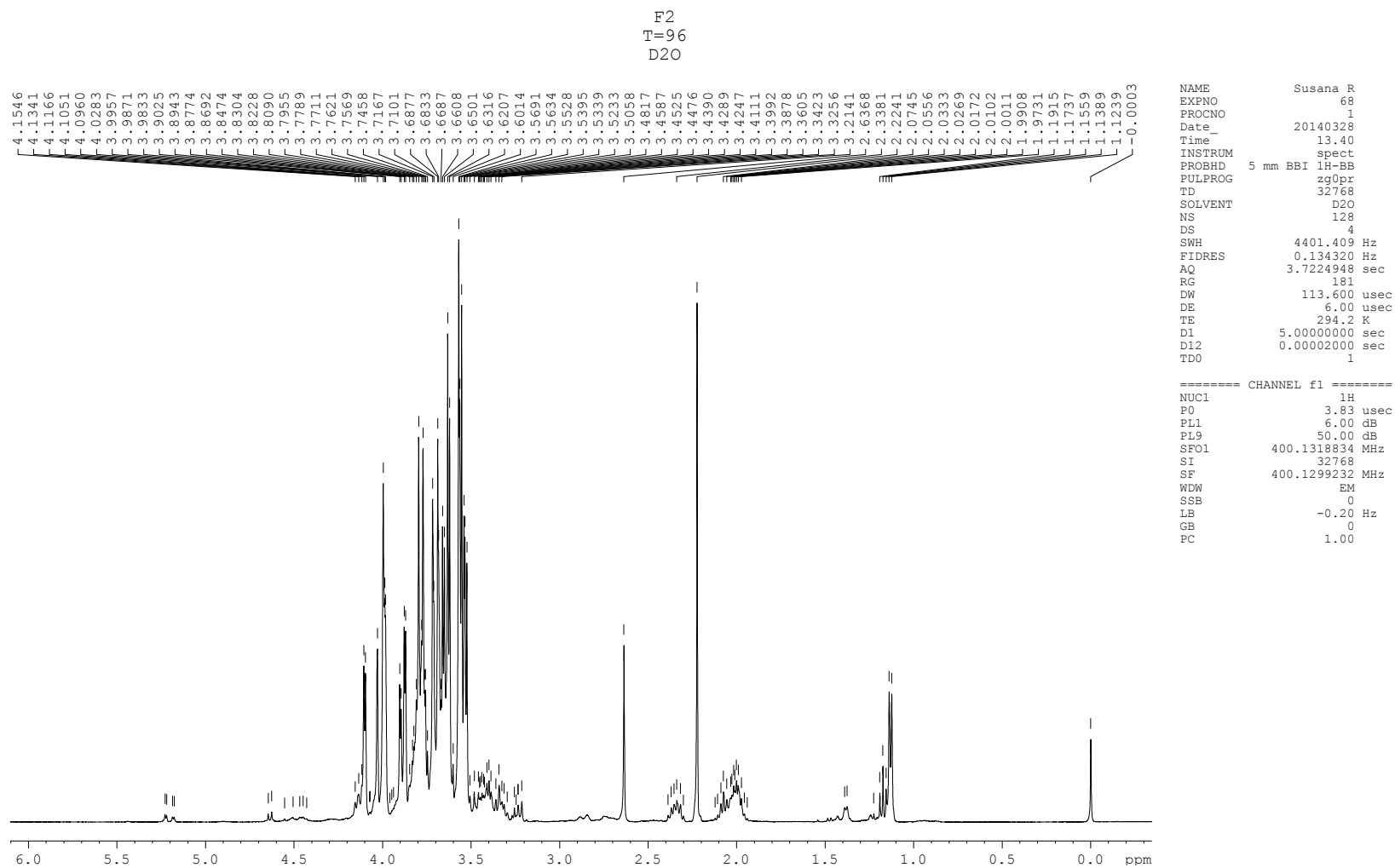
— 215.3346



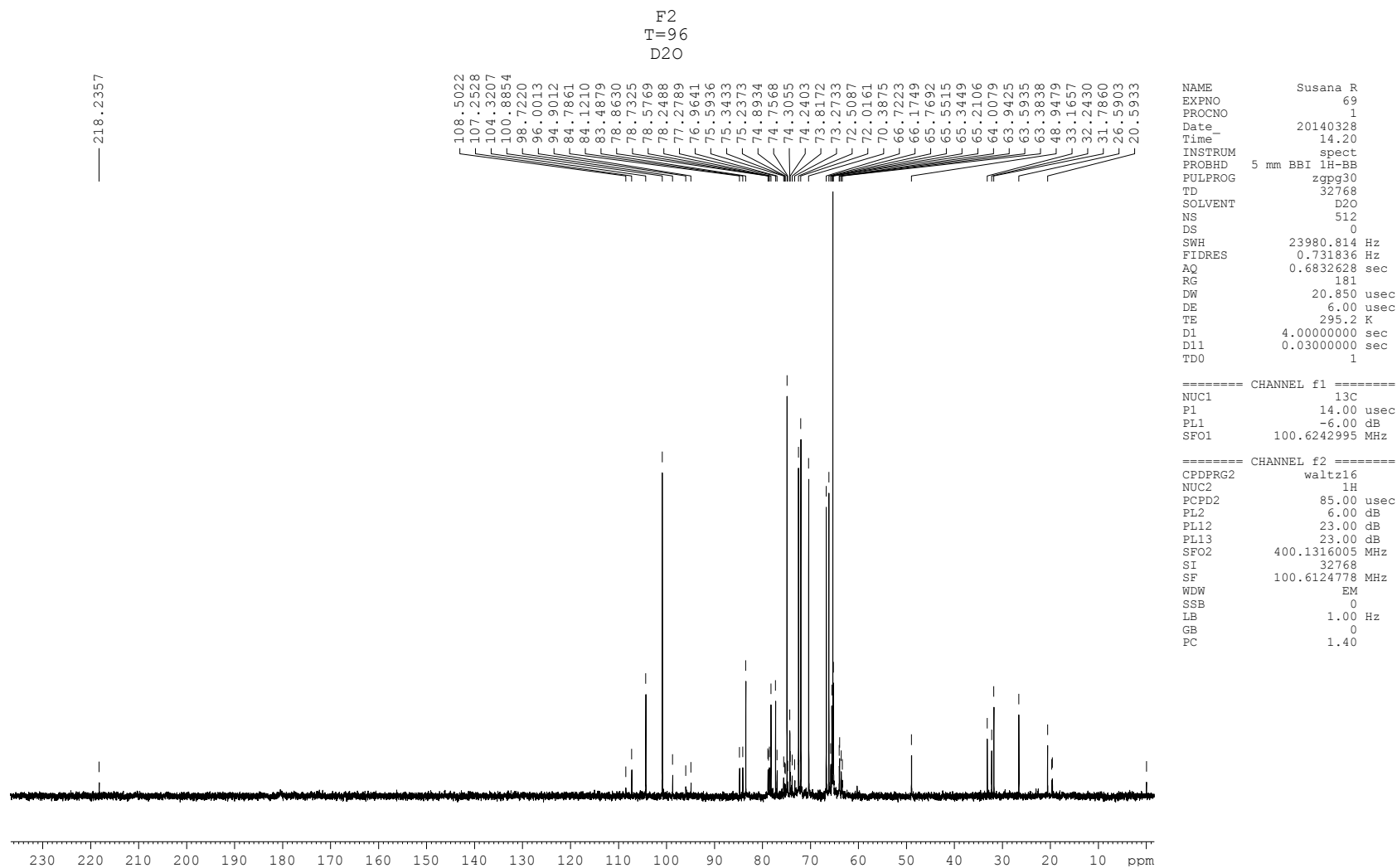
Espectro de ¹³C RMN de la fermentación F2 a t=48 h. Con TSP.



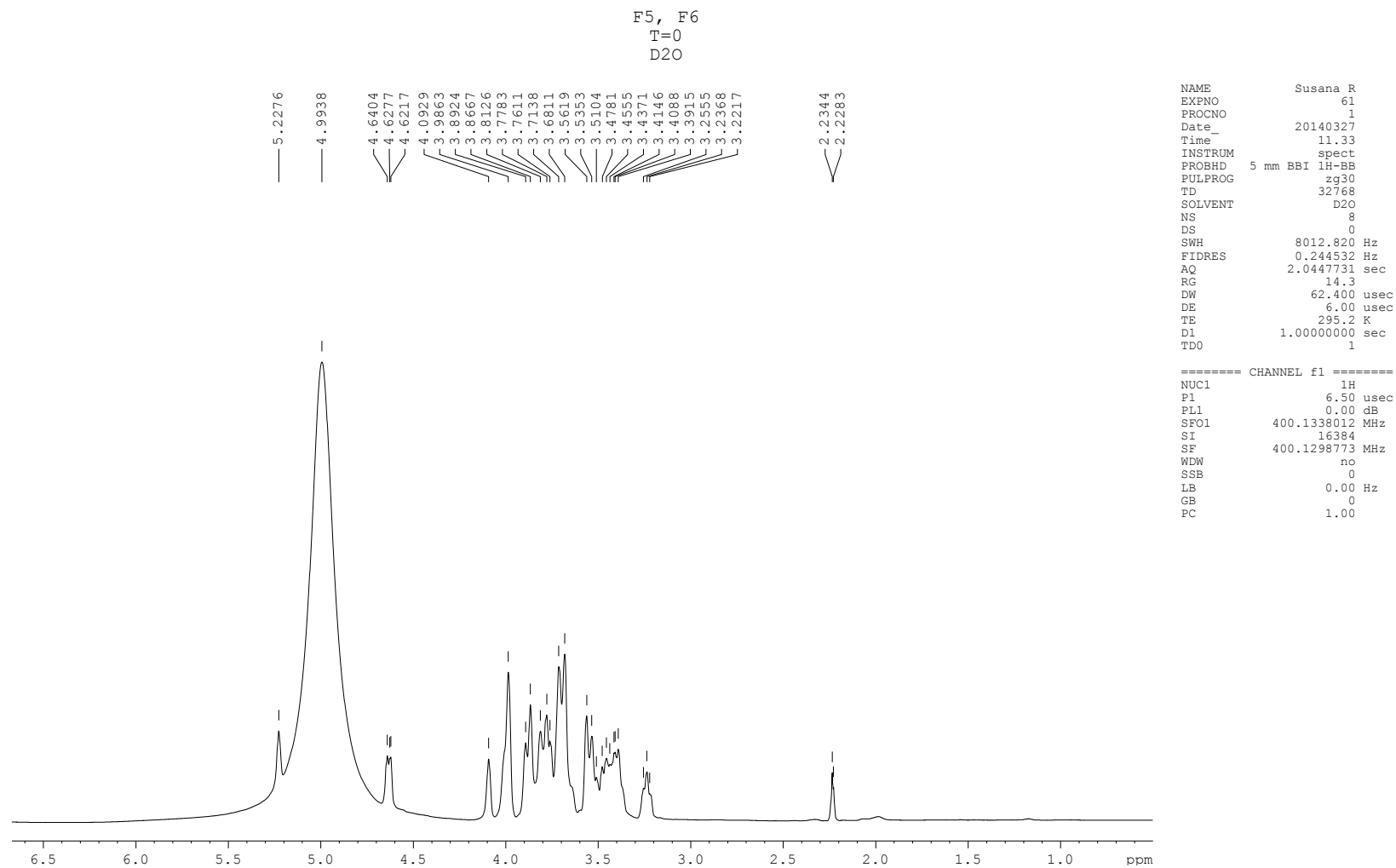
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F2 a $t=96$ h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



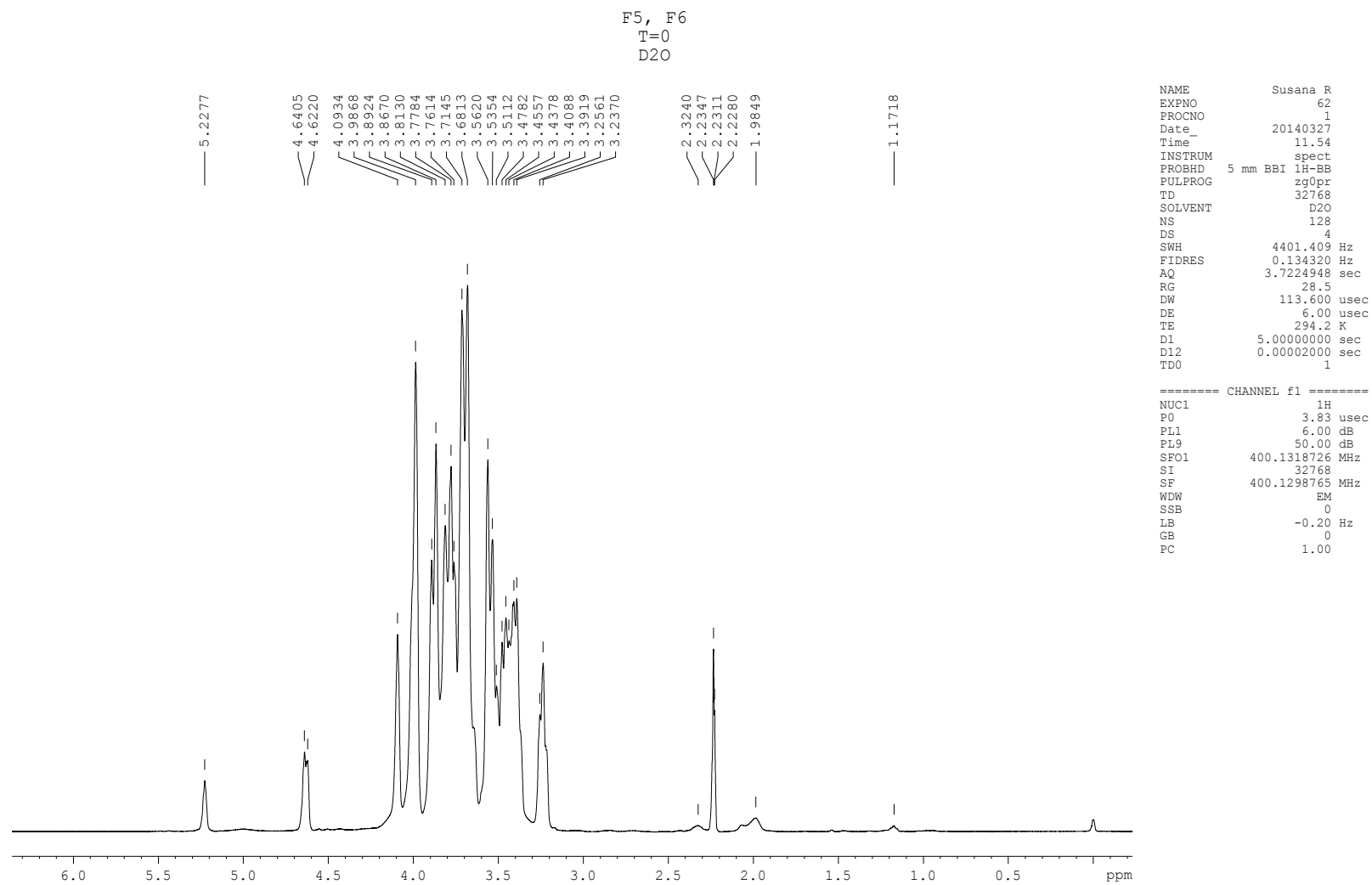
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F2 a $t=96$ h. Con supresión de disolvente. Con TSP.



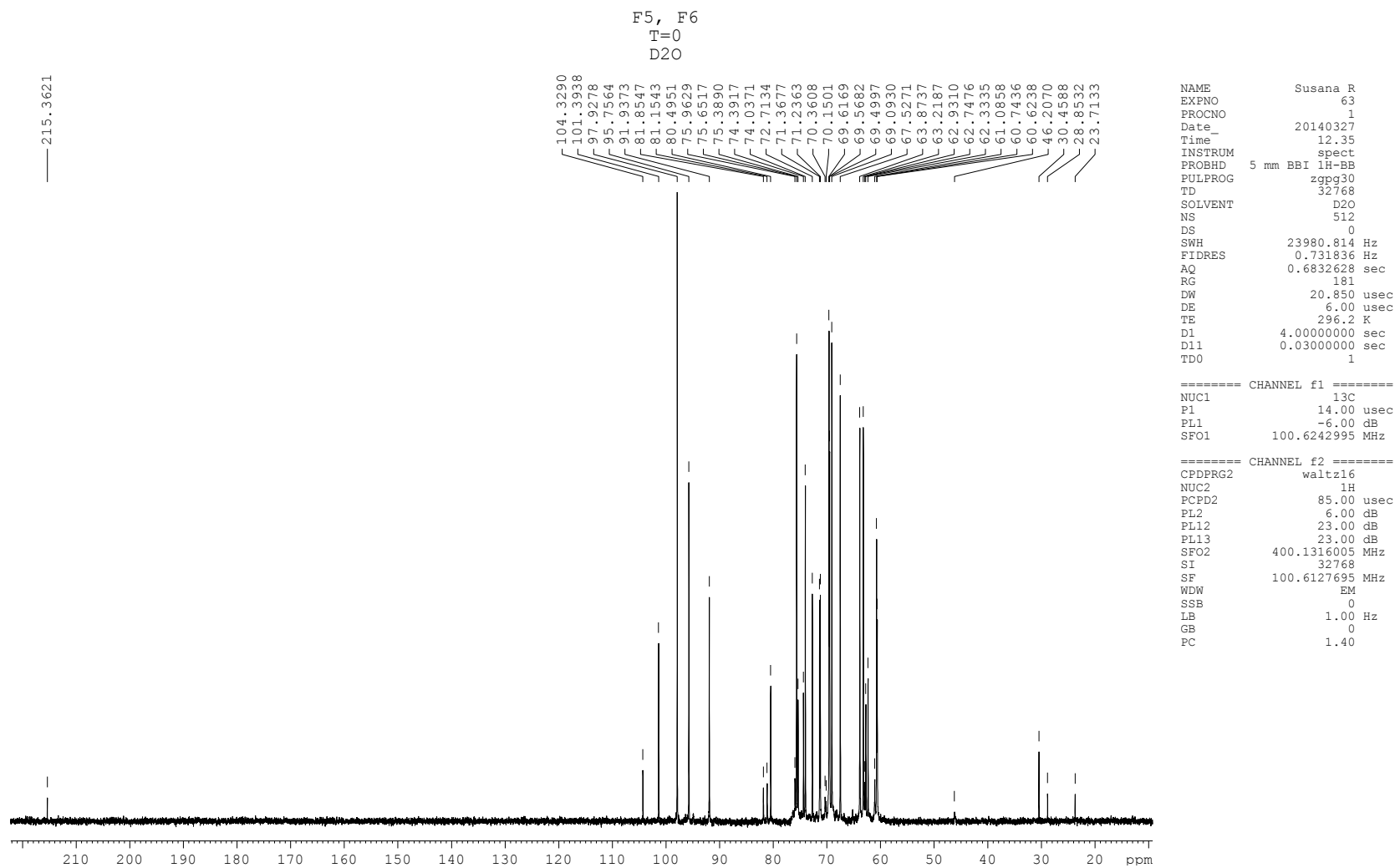
Espectro de ¹³C RMN de la fermentación F2 a t=96 h. Con TSP.



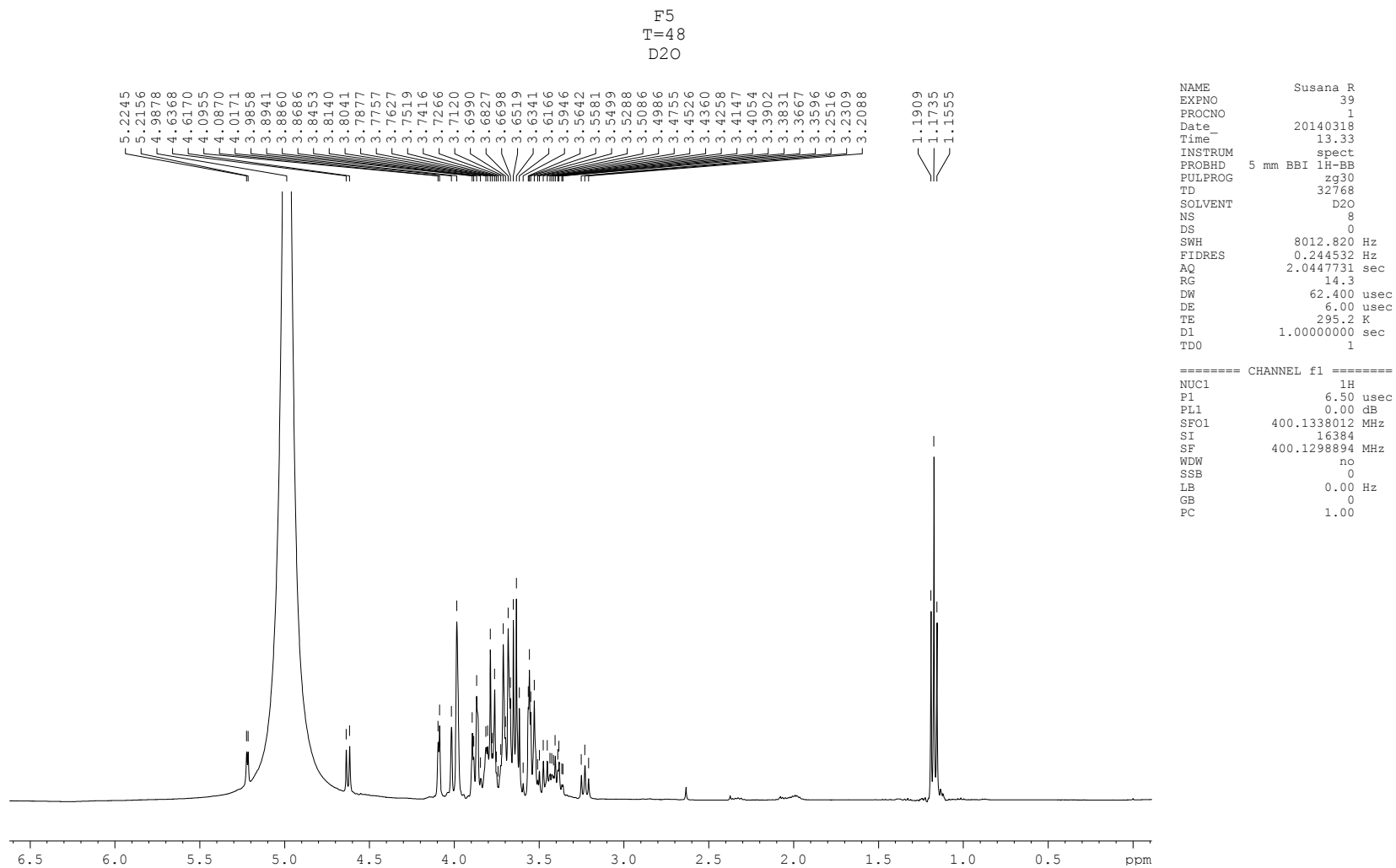
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F5 y F6 a $t=0$ h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



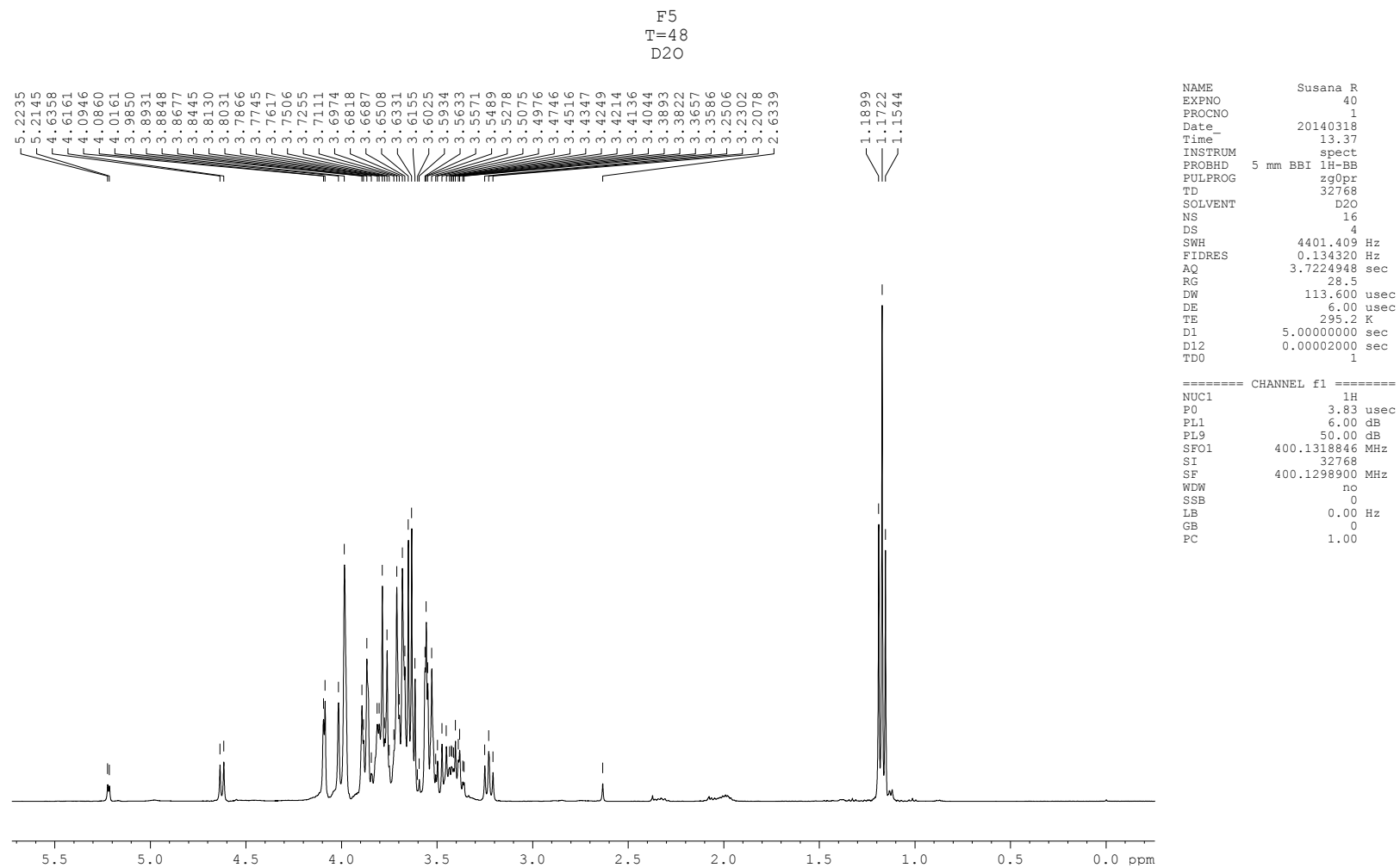
Espectro de ^1H RMN de la fermentación F5 y F6 a $t=0$ h. Con supresión de disolvente. Con TSP.



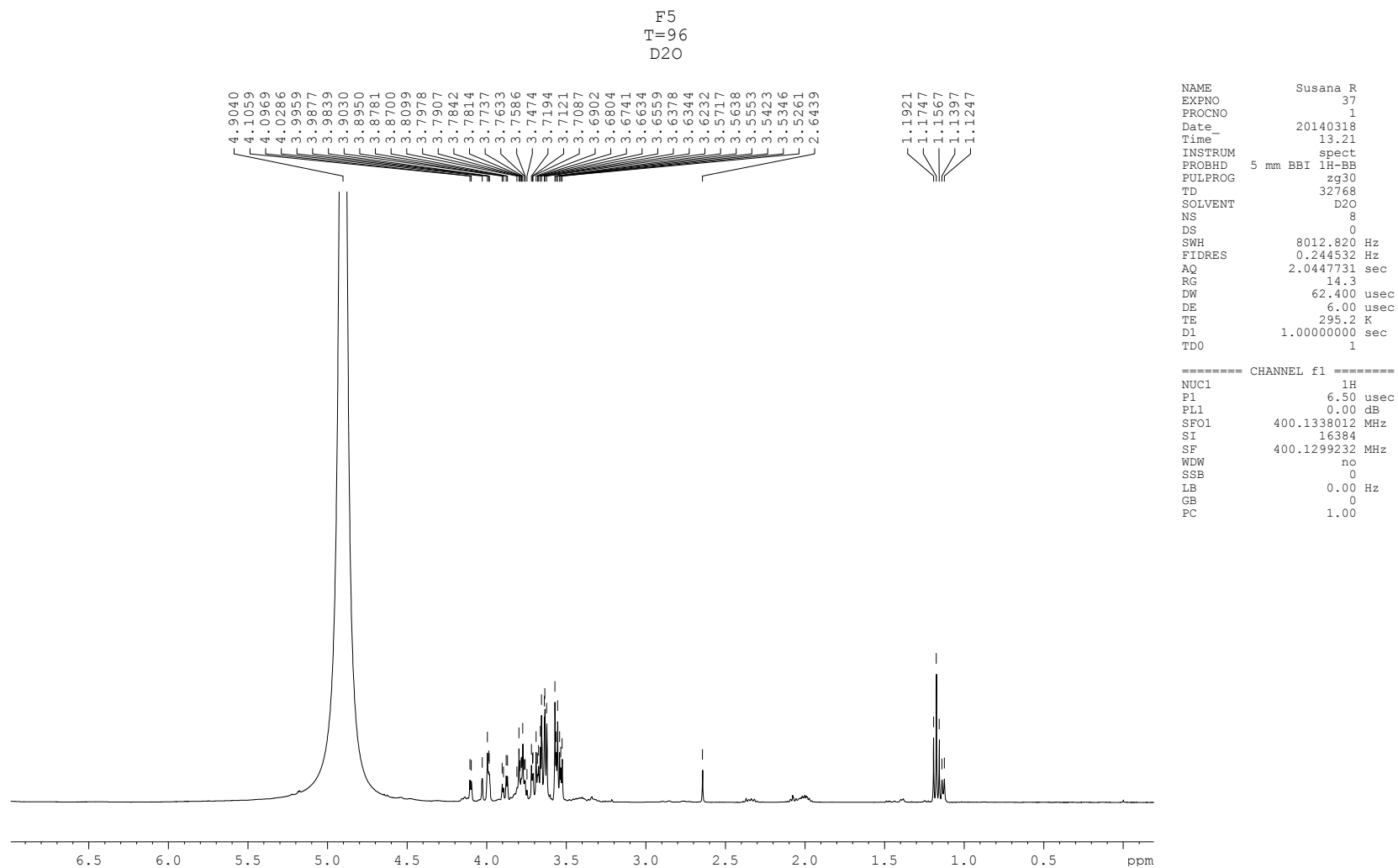
Espectro de ¹³C RMN de la fermentación F5 y F6 a t=0 h. Con TSP.



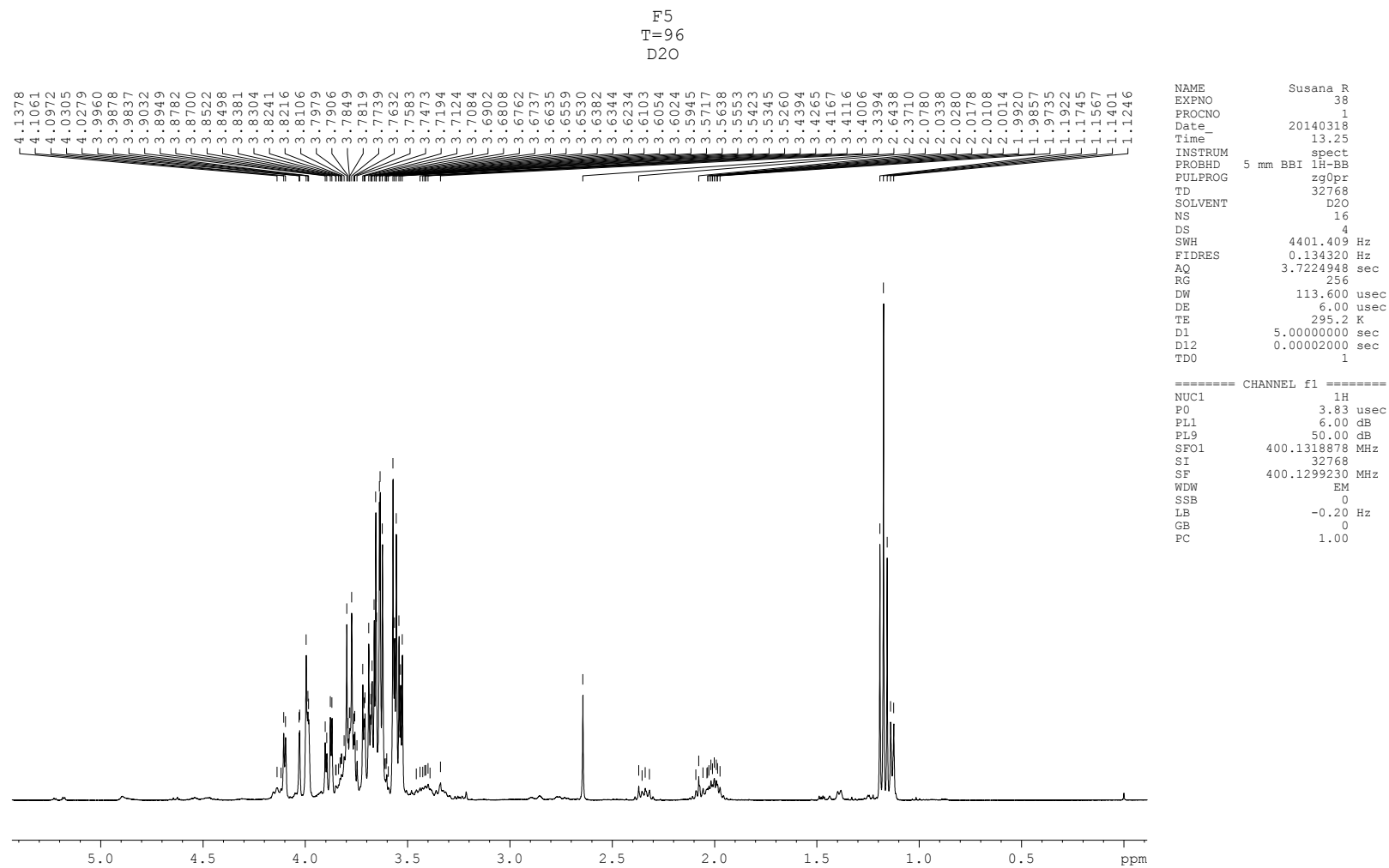
Espectro de ¹H RMN de la fermentación F5 a t=48 h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



Espectro de ^1H RMN de la fermentación F5 a $t=48$ h. Con supresión de disolvente. Con TSP.



Espectro de ¹H RMN de la fermentación F5 a t=96 h. Sin supresión de disolvente. Con TSP.



Espectro de ^1H RMN de la fermentación F5 a $t=96$ h. Con supresión de disolvente. Con TSP.

Anexo 5. Espectros de ^1H RMN de aminoácidos comparados con las muestras de mosto en fermentación.

