



Universidad
Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado

Caracterización química del aroma y sabor de productos diversos

Chemical Characterization of The Aroma And Flavor of
Diverse Products

Autor

Javier J. Gimeno Navarro

Director

Vicente Ferreira González

Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.
Zaragoza, 2018

Índice

Resumen en español	Pág. 4
Abstract	Pág. 5
Introducción	Págs. 6-9
Objetivos	Pág. 9
Material y métodos	Págs. 9-18
Resultados y discusión	Págs. 18-23
Conclusión	Pág. 23-24
Bibliografía	Pág. 24-25

Resumen

Este trabajo se ha centrado en el estudio de los compuestos volátiles que proporcionan el aroma de la borraja debido a que el consumo de ésta se encuentra en auge. Además no hay estudios previos acerca de su aroma.

En el estudio se ha tratado la metodología de extracción, realizándose una extracción en fase sólida (para el agua de borraja) y dos extracciones usando el método de purga y trampa (para la borraja cruda y la cocida). Los extractos obtenidos por los métodos anteriores fueron sometidos a cromatografía de gases olfatometría (GC-O) para la obtención de un perfil olfatométrico de la borraja. La técnica de cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS) se utilizó como técnica de apoyo a la hora de identificar algunas de las moléculas odorantes.

La extracción de purga y trampa para la borraja se completó en un tiempo de 30 minutos. De las tres muestras, sólo de la borraja cocida no se pudo obtener un perfil olfatométrico. Los resultados que se obtuvieron mostraban que el agua de la borraja cocida presentaba un mayor número de zonas de olor que la borraja cruda, predominando en ambos casos los olores vegetales tales como los de la 1-octen-3-ona y la Z-1,5-Octadien-3-ona. En la borraja cruda, otra de las moléculas odorantes con gran importancia en su perfil olfatométrico era la 2-isopropil-3-metoxipirazina y el E-2-nonenal, y en el agua de borraja, moléculas odorantes con descriptores no vegetales tenían también una gran relevancia en su perfil olfatométrico, como es el caso de la 2-acetil-1-pirrolina.

Abstract

This work focuses on the volatile compounds responsible for the aroma of borage, which is a product whose consumption is growing and for which, to the best of our knowledge there are no previous studies.

The study carried out dealt first with the extraction methodology. A direct solid phase extraction has been applied for borage water and two purge and trap extractions were finally used for raw borage and boiled borage. All the extracts obtained by the previous methods, all of them wearing characteristic borage odors, were subjected to gas chromatography olfactometry (GC-O) to obtain an olfactometric profile of borage. The gas chromatography technique coupled with mass spectrometry (GC-MS) was used as a support technique to identify some of the odorant molecules.

The purge and trap extraction of borage was completed in a 30 minute period. For two of the samples, borage water and raw borage, satisfactory GC-Olfactometric profiles were obtained. Results showed that borage water had a higher number of odor zones than the raw borage, with vegetable odors predominating in both cases such as 1-octen-3-one and Z-1,5-Octadien-3-one. In raw borage another odorant molecules with great importance in their olfactometric profile were 2-isopropyl-3-methoxypyrazine and E-2-nonenal, and in borage water odorant molecules with non-vegetable descriptors also had great relevance in their olfactometric profile as it is the case of 2-acetyl-1-pyrroline.

1. Introducción

El sistema olfativo de los mamíferos es bastante discriminativo. Aunque se piensa que los seres humanos tienen el sentido del olfato mucho menos desarrollado que otros animales, nuestro olfato es capaz de percibir un amplio número de químicos volátiles [7]. La importancia sensorial de los compuestos volátiles provenientes de los alimentos y que llegan a la nariz depende del grado de volatilidad de estos compuestos, de su interacción con la matriz del alimento y de sus características organolépticas. En la mayor parte de los casos solo una pequeña parte de todos los volátiles liberados son los que contribuyen al aroma del alimento, por lo que, el diferenciar los compuestos que realmente son portadores de sensaciones olfativas de entre todos los volátiles liberados en cierto alimento es uno de los quehaceres más importantes en la determinación del sabor de los alimentos [8].

Hay una gran cantidad de compuestos que poseen la característica del olor, y que por tanto pueden ser percibidos a través de los epitelios olfativos, ya tengan descriptores positivos (agradables) o negativos (desagradables), y que pueden ser generados por diversidad de organismos (flores, bacterias,...) [23]. En general las moléculas odorantes tienen bajo peso molecular (inferior a los 300 Dalton), son volátiles, estos es, pueden pasar a estado gas con relativa facilidad y suelen ser no muy polares. Las moléculas que cumplen estos requisitos y llegan a nuestra nariz, se disuelven en la mucosa nasal, por donde son transportadas hacia el epitelio olfativo. Este epitelio se encuentra en las fosas nasales, donde están los receptores olfativos que están formados por proteínas trans-membrana con centros activos de diversa especificidad. Estos centros son capaces de interactuar con las moléculas odorantes generando un cambio conformacional que acaba en una corriente eléctrica que inicia un complejo proceso de procesamiento en el bulbo olfativo. Éste codificará la corriente y la enviará al sistema límbico, el cual procesará y traducirá la información recibida, haciéndonos sentir el olor de la molécula fragante [7,9].

El olor específico de una molécula es el resultado del número de receptores que es capaz de activar y de la intensidad con que lo hace. Puesto que algunos receptores responden específicamente a ciertos grupos funcionales, es posible asociar en ocasiones un olor tipo con un grupo funcional. Por ejemplo, los alcoholes n-alifáticos tienen olores a alcohol, los aldehídos alifáticos de entre 6 y 12 átomos de carbono tienen a olores a herbáceo, limón y naranja, varios heterociclos con nitrógeno tienen olores relacionados con comida asada o tostada, mientras que muchos fenoles volátiles tienen olores a humo. Pero el olor específico de la molécula viene finalmente determinado por casi todas sus características estructurales y funcionales. La longitud de las cadenas, el número y posición de dobles enlaces, la isomería cis-trans e incluso la estereoquímica, tienen influencia en las notas percibidas. A menudo, un pequeño cambio en la estructura química puede dar lugar a un cambio drástico en el olor de ésta. Un ejemplo que podría mencionarse sobre este cambio estructural son las diferencias estereoquímicas; normalmente uno de los enantiómeros tiene un olor más fuerte que el otro, aunque hay casos en los que la diferencia de la estereoquímica repercute en el olor percibido, como sería el caso

del (S)-(-)-limoneno cuyo olor recuerda al pino mientras que el (R)-(+)-limoneno tiene un olor a naranja [9].

Es pues que los olores de los productos provienen de un conjunto de distintos odorantes, cada uno de ellos con un olor típico, lo que acaba resultando en el perfil característico de odorantes de dicho producto. El perfil de odorantes suele variar ligeramente de muestra a muestra, en función de la variedad y del procesado; repercutiendo en las pequeñas diferencias observadas entre muestras en olor, sabor y calidad percibida. En algunas muestras pueden aparecer problemas sensoriales, que son siempre debidos a alteraciones relevantes del perfil de odorantes, bien por un cambio importante del perfil de odorantes constitutivos, bien por la aparición de odorantes “negativos” (aparición de odorantes nuevos no comunes en la muestra o desaparición de odorantes típicos). Estos cambios pueden ser debidos a problemas metabólicos inducidos por diversos factores agronómicos, climáticos o biológicos o incluso a contaminaciones externas. El conocimiento de las moléculas implicadas es esencial para determinar las rutas metabólicas, y en su caso los genes, responsables del cambio. En el caso de aromas muy conocidos, como (-)-mentol y (-)-carvona, responsables del aroma de menta, se conocen todas las reacciones metabólicas, las enzimas implicadas y los distintos intermedios [1], lo que permite interpretar cualquier alteración aromática. Sin embargo, no se han encontrado trabajos que aborden el estudio de alimentos de la región, como puede ser la borraja, cuyo estudio se ha abordado en este TFG, mediante la técnica de Cromatografía de Gases-Olfatometría (GC-O).

La borraja o *Borago Officinalis* L. es una planta cuyo cultivo y consumo se da principalmente en la zona del valle del Ebro, más concretamente en Aragón, La Rioja y Navarra [10]. Esta planta se puede encontrar de forma silvestre o se puede cultivar. De forma silvestre aparece en la época de la primavera, siendo considerada en ciertas partes de España (principalmente en el sur y en el levante mediterráneo) como una mala hierba que se caracteriza por sus llamativas flores azules. La borraja cultivada, sin embargo, se cosecha todo el año. Como se deduce de su nombre científico esta planta pertenece a la familia de las borragináceas, son plantas anuales de corta vida y que pueden alcanzar una altura entre 50-100 cm. Es muy útil toda ella, también sus semillas, e incluso las hojas, tallos y flores son comestibles. Esta planta se caracteriza por unos tallos tubulares recubiertos de unos pelillos punzantes (suele ser aconsejable usar guantes a la hora de limpiarla para cocinarla), posee un color verde apagado y tiene unas hojas con una forma algo ovalada con pelillos que suelen ser de una altura de entre 5-15 cm. Aunque pertenece al mundo de las hierbas, si esta se seca pierde todas sus propiedades aromáticas y todo su sabor, todo lo contrario a lo que sucede con el tomillo, la albahaca, y otras plantas aromáticas [2].

Estudios realizados en el yacimiento celtíbero de Segeda, cerca de Calatayud, muestran que este vegetal ya era consumido hace unos 2200 años, incluso los griegos (que la denominaban *Eupitrosyon* -bienestar), los romanos (que la denominaban *Borago* o *Borra*, que significa pelo, -uno de los posibles orígenes de la palabra actual), y los árabes (que la denominaban *buaraj* o *abou-rash*, que significan, “padre del sudor” y “planta del sudor” respectivamente) lo consumían por sus propiedades

medicinales, siendo una forma de prevenir o curar enfermedades. Se conoce desde antaño y actualmente se cultiva en varias partes del mundo, pero es en el valle del Ebro (y en Aragón se da el 90 % de la producción) donde se hace de forma masiva para la alimentación [11]. Debido a sus múltiples propiedades (diurética, antiinflamatoria y sudorífica) y usos, el interés en el estudio de la borraja cada vez es mayor, pudiendo encontrarse varios estudios sobre este alimento [2,11]. Se ha determinado que las semillas de esta planta tienen ciertos ácidos fenólicos (rosmarínico, siríngico, sinápico) [12], que tienen un perfil de triacilglicéridos bastante complejo (debido a su peculiar composición de ácidos grasos), es por ello que el aceite de las semillas de la borraja se usa en la industria farmacéutica por su elevado contenido en ácido γ -linoleico [13]. De las hojas de la borraja se han determinado ciertos alcaloides pirrolizidínicos, como la licopsamina y también trazas de supinidina viridiflorato (el (+) se denomina cinaustina y el (-) amabilina) [14].

Puesto que la característica que diferencia a una molécula odorante de otra volátil que no lo es, es su olor, la única manera de abordar el estudio de los odorantes responsables de las propiedades sensoriales de un producto, es combinando técnicas de aislamiento químico con la evaluación sensorial, para los gases la cromatografía de gases (GC) y para los olores la olfatometría.

La cromatografía gas (GC) es una técnica de separación en la que la fase móvil es un gas y la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido. La separación de los componentes se basa en que éstos se desplazan a unas velocidades distintas según la interacción que tengan con la fase estacionaria (para fases polares, a mayor tamaño y polaridad de la molécula, más lentamente avanzará por la columna). Una de las ventajas de esta técnica es la pequeña cantidad de muestra necesaria para realizar el análisis (1 μ L). Las características de la separación (eficiencia y selectividad) dependen de las dimensiones de la columna empleada (diámetro del tubo, espesor de la fase y longitud) y de la polaridad de la fase estacionaria escogida. Por ello, esta técnica se usa en una amplia gama de problemas analíticos como es en la industria petroquímica, las drogas, el análisis clínico o en la ciencia de los alimentos [3].

La cromatografía de gases olfatometría (GC-O) es la técnica que se usa para examinar cuáles son los compuestos volátiles responsables de aromas y olores. Esta técnica comprende la separación de los componentes del extracto en una columna de cromatografía gaseosa, seguido de una separación del efluente de la columna entre el detector físico y el puerto olfatométrico [15]. Esta técnica se usa mucho en estudios relacionados con la alimentación para determinar los compuestos que generan el olor de los alimentos, usándose la nariz humana para la detección de dichos compuestos [8,16]. En esta técnica un grupo de personas entrenadas, denominadas jueces (personas que han sido específicamente entrenadas para realizar una tarea bien definida), hacen uso de la nariz como detector, huelen el efluente durante la ejecución del programa del GC y van apuntando los datos requeridos: los descriptores del aroma, el tiempo al que se huelen y la intensidad [15].

El tiempo de retención en GC depende de la molécula, de la fase estacionaria y de las condiciones operativas. Empleando una estandarización con alcanos, se obtienen los índices de retención (IR), que son independientes de las condiciones operativas y tan solo dependen de la molécula y de la fase estacionaria, lo que constituye un criterio racional de identidad de la molécula. Dado que muchas moléculas diferentes pueden tener IRs similares, los IRs se calculan en columnas cromatografías de diferente polaridad. Los IRs en dos columnas de fase distinta (típicamente una no polar de metilpolisiloxano y una polar de polietilenglicol) son una ayuda esencial para la identificación de moléculas odorantes, ya que en la operación olfatométrica, la única información totalmente fidedigna de que disponemos es el tiempo de retención del olor [8,15]. Los datos de IR y los descriptores aromáticos obtenidos no son considerados, sin embargo, pruebas suficientes acerca de la identidad del odorante. Por ello se recurre a la cromatografía gas acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) que permite obtener el espectro de masas y relacionarlo con los almacenados en bases de datos, como la que ofrece el National Institute of Standards and Technology (NIST). No obstante, la identidad de la molécula no se considera definitiva hasta que se comprueba con ayuda del patrón químico puro que índices de retención en dos fases distintas, olor y espectro de masas son idénticos a los del odorante problema.

2. Objetivos

Debido al hecho de no haber estudios existentes sobre las moléculas fragantes de la borraja, el objetivo principal de este TFG es elucidar el perfil de odorantes potencialmente responsables del aroma y sabor característico de la borraja tanto cruda como cocida. Los objetivos operativos son:

- La obtención de una serie de extractos representativos de las propiedades aromáticas de la borraja.
- La realización del estudio GC-O para determinar el perfil de odorantes de cada muestra.
- Con la ayuda de algunas bases de datos (como Pherobase o Flavornet) [24,25] y el uso de los espectros obtenidos en el GC-MS, se identifican o proponen las identidades más probables de los diversos odorantes.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales y reactivos.

Debido a las diferentes metodologías que se emplearán en este trabajo, los materiales necesarios para su realización son los que se mencionan a continuación:

- Agua milli-Q obtenida tras la purificación de agua con la ayuda de un aparato de ultrapurificación de agua de Millipore (Burlington, Massachusetts, USA).

- Cuerpos de jeringas de 1 mL de volumen interno (0,58 cm de diámetro interno) de polipropileno (PP) y frits de polietileno (PE) para esos tubos de Supelco (Bellefonte, PA, USA).
- Resinas LiChrolut EN (tamaño de partícula 40-120 μm) de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Diclorometano (calidad GC, 99,8 % de pureza) de Fischer Scientific UK (Loughborough, Leics, UK).
- Metanol (calidad GC, 99,8 % de pureza) de Fischer Scientific UK (Loughborough, Leics, UK).
- Disolución de alcanos lineales (comercial), desde C7 a C30, en diclorometano.
- Nitrógeno (pureza de 99,8 %) de Air liquide (París, Francia).

3.2. Preparación de muestras.

BORRAJA CRUDA: La borraja usada en este trabajo se compró en una cadena de supermercados, y cuyo suministrador es Gil y Pallares S.L. El primer paso tras adquirir la borraja (FIGURA 1), es limpiarla totalmente, es decir, quitar las hojas, quitar los pelos del tallo y lavarla con agua milli-Q (agua ultrapura), ya que se quiere evitar a toda costa cualquier posible interferencia.



Fig. 1. Borraja sin preparar

Los tallos se cortan en un tamaño aproximadamente igual a una falange, no mucho mayor a ésta (FIGURA 2), y se introducen en el frasco de pyrex de 1 L; que se mantiene cerrado y con una atmosfera inerte de nitrógeno, para evitar la oxidación de esta, hasta obtener un peso de 300,7 g de borraja limpia.



Fig. 2. *Tamaño aproximado de los trozos de borraja cortados*

BORRAJA COCIDA: Para preparar la muestra se procedió de manera similar a la borraja cruda, se limpió la borraja, se lavó con agua milli-Q, y se cortaron los tallos de la misma manera hasta obtener un peso de borraja de 300 g. Sin embargo esta borraja se introdujo en una olla a presión con agua milli-Q y se coció, durante aproximadamente 10 minutos (FIGURA 3). Una vez cocida, la borraja se metió en un frasco de pyrex con la menor cantidad de agua posible. En otro de los frascos de pyrex se metió el agua de la borraja cocida, ya que resultaba interesante analizar los compuestos de aroma que habían quedado en esta agua.



Fig. 3. *Olla a presión cociendo la borraja en agua milli-Q.*

3.3. Obtención de extractos.

3.3.1. Purga y trampa (P&T).

La metodología de extracción fue purga y trampa (P&T). Esta metodología consistía en el arrastre de los vapores del espacio de cabeza con un gas inerte (N_2) y atrapamiento en un sorbente (LiChrolut EN). Para la realización de este tipo de extracción se debieron realizar los siguientes pasos descritos:

3.3.1.1. Acondicionamiento del cartucho

Lo primero que se debe hacer para poder realizar la extracción de los volátiles de la borraja cruda o cocida es preparar el lecho de extracción. Este se prepara en un cuerpo de jeringa de 1 mL de PP embutiendo 100 mg de resina (LiChrolut EN), donde se retendrán los volátiles, entre 2 frits de PE que conformarán el lecho cromatográfico, obteniéndose de esta manera el cartucho de filtración. Una vez la resina está en el cartucho, el siguiente paso consiste en limpiarlo pasando 5 mL de diclorometano. Para ello nos ayudamos de un reservorio de 25 mL, pues la capacidad del cartucho es inferior al volumen del diclorometano necesario para acondicionarlo. Una vez ha pasado todo el diclorometano, y ha limpiado bien toda la resina, ésta se seca mediante el uso de una bomba de vacío el tiempo necesario.

3.3.1.2. Dispositivo

Como se ha comentado con anterioridad, la borraja fue emplazada en un pyrex de vidrio en atmósfera de nitrógeno (1L). En este frasco de pyrex se introduce un tubo de vidrio (tipo borboteador) por el que será introducida la corriente de nitrógeno que se usa para que arrastre los volátiles de la borraja. A la salida de este tubo se sitúa el cartucho con la resina que se ha acondicionado previamente, que se usará como trampa para los volátiles de la borraja (FIGURA 4). El tubo de vidrio llega casi al fondo del frasco de pyrex; por lo que para evitar la posible obturación del tubo con la borraja, antes de iniciar la corriente de N_2 a través del tubo, se debe observar el fondo del frasco para asegurarse de que este tubo no esté obturado y no haya nada que impida así el arrastre de los volátiles por la corriente de N_2 . En caso de que pudiera estarlo, es necesario mover el frasco para eliminar la obturación.

3.3.1.2.1. Borraja cruda

Se estableció un flujo de N_2 típico, de 500 mL/min (medido con un burbujímetro para establecer el caudal correcto y regulando la presión de entrada) (FIGURA 4). Toda la muestra sólida que se preparó inicialmente se usó para la obtención del extracto.



Fig. 4. Frasco de pyrex con la borraja cruda y el tubo por el cual va a pasar la corriente de nitrógeno. El cartucho que va a recoger los volátiles que son arrastrados por la corriente de N_2 está emplazado al final del dispositivo.

3.3.1.2.2. Borraja cocida con agua

A pesar de que inicialmente se partió de 300 g de borraja para su cocción, finalmente la masa de borraja recuperada fue de 243,0 g. Esta masa de borraja se introdujo en el frasco de pyrex y se añadió una cantidad de agua en este equivalente al 10 % en masa de la borraja metida (unos 24 g de agua), obteniendo una masa total final de 267,7 g entre la borraja y agua de la borraja cocida.

En esta ocasión, la realización del arrastre de volátiles, se realizó en un baño termostaticado con el agua a una temperatura entre 45-55 °C (FIGURA 5), temperatura a la que se suele consumir este producto. Debido a la humedad del sistema y la temperatura de realización, se estableció un flujo de N₂ por el frasco de 200 mL/min.



Fig. 5. Frasco de pyrex con borraja cocida + agua en un baño termostaticado a 45 °C

3.3.1.3. Optimización del tiempo de extracción

Un punto clave en la extracción de efluentes gaseosos mediante la técnica de P&T es asegurar que no se supera lo que se denomina volumen de ruptura del sistema de extracción (momento en el cual los componentes más volátiles del efluente ya no son retenidos). Cuando esto ocurre, el efluente comienza a mostrar el olor correspondiente a las moléculas que ya no se retienen, y por tanto, a partir de ese momento el cartucho ya no contendrá una fracción perfectamente representativa del olor del producto a estudio. Por ello fue necesario controlar este parámetro en ambos dispositivos.

3.3.1.3.1. Borraja cruda

En el caso de la borraja cruda, se observó que tras los primeros 30 min. el cartucho ya desprendía un olor vegetal muy fuerte, hecho que señalaba que el cartucho ya estaba empezando a saturarse. Por ello se paró el flujo de nitrógeno y se extrajo el cartucho del sistema.

3.3.1.3.2. Borraja cocida con agua

En la borraja cocida se observó igualmente que tras media hora de arrastre, el cartucho comenzaba a desprender un olor a coliflor, indicando saturación. Por ello se quitó la corriente de N₂ y el cartucho del sistema.

3.3.1.4. Secado del cartucho

Una vez se extrajeron los cartuchos del espacio de cabeza, se prosiguió con el secado de éstos con una corriente de nitrógeno muy suave a fin de eliminar la humedad de la resina. Esta etapa sólo llevó un par de minutos, hasta que se observó que la resina estaba suelta.

3.3.1.5. Elución

La elución de la resina se llevó a cabo con 1 mL de una disolución de diclorometano conteniendo un 5 % de metanol y se recogió en un vial ámbar para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases. Esta elución, se llevó a cabo gota a gota.

3.3.1.6. Concentración

El extracto obtenido en la etapa anterior se introdujo en un concentrador Kuderna graduado y se expuso a una corriente de N₂ (lo más suave posible para evaporar el disolvente y reducir el volumen de disolución hasta 200 µL). Para evitar la concentración preferente en la parte superior del líquido, la disolución fue homogeneizada introduciendo pequeñas burbujas con la ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez obtenido el volumen deseado, se trasvasó a un vial de inserto y se conservó en el congelador.

3.3.2. Extracción en fase sólida (SPE) directa del agua de borraja.

Como complemento a los extractos anteriores, se llevó a cabo una extracción en fase sólida del agua de cocción de la borraja. Para eliminar los sólidos remanentes (fibras de borraja) antes de la extracción, el agua de borraja se filtró a través de un embudo Büchner con filtro de papel.

El lecho de extracción se preparó igualmente con 100 mg de resina (LiChrolut EN) y se acondicionó con 3 mL de diclorometano, luego con 3 mL de metanol y finalmente con 3 mL de agua milli-Q, percolados todos ellos sin activar la bomba de vacío para evitar que el lecho se seque.

Una vez acondicionado el lecho, se hacen pasar 100 mL del agua de borraja filtrada a través del cartucho. Hay que destacar que la resina del cartucho debe estar mojada en todo momento para garantizar un buen contacto entre el lecho cromatográfico y la muestra a extraer. Este paso se realizó con una bomba de vacío pero manteniendo un flujo gota a gota.

Una vez extraídos los 100 mL del agua de borraja, se lava el cartucho con 4 volúmenes muertos de agua milli-Q para eliminar sustancias más polares. Como se detalla en el apéndice, el volumen muerto del lecho se estimó en 0,13 mL, por lo que se pasaron 0,53 mL de lavado (Anexo 1). Una vez lavado el cartucho, se secó a vacío.

Finalmente se eluyó con la disolución diclorometano (5% metanol) en un vial. Esta disolución tenía un olor muy potente y no hizo falta concentrar.

3.4. Metodología de análisis.

3.4.1. Cromatografía de gases-olfatometría (GC-O)

3.4.1.1. Panel olfatométrico

El panel olfatométrico estuvo formado por un grupo de 6 personas, los jueces o sniffers, que realizaron la evaluación de las muestras por el sistema de GC-O. Estos jueces fueron entrenados antes de comenzar con la evaluación de la muestra con extractos de muestras similares a la de estudio.

La olfatometría de la muestra comprendía la evaluación olfativa desde el minuto 3 del cromatograma (tras la elución del diclorometano) hasta el minuto 40 (FIGURA 6). Para evitar la fatiga, la olfatometría se dividía en dos partes, por lo que eran necesarias 2 personas, una que olía desde el minuto 3 hasta el 22 y la segunda del 22 hasta el 40. Durante la olfatometría los jueces debían apuntar los tiempos a los que salía cada olor, el descriptor (a qué olía), y la intensidad con la que lo percibían. La intensidad podía puntuar desde 0,5 hasta 3, siendo 0,5 un olor muy tenue y el 3 un valor fortísimo; permitiéndose los valores intermedios (6 valores siendo la diferencia de 0,5 entre valores consecutivos). Como estaba dividida la olfatometría en dos partes, cada sniffer debía oler también la parte complementaria (con una nueva inyección del extracto) para que cada juez evaluara todo el extracto.



Fig. 6. Sniffer oliendo los componentes de uno de los extractos en cromatógrafo de gases con columna VF5-ms.

3.4.1.2. Cromatografía de gases acoplada a olfatometría (GC-O)

Preparados los extractos, se procedió a su análisis GC-O en 2 cromatógrafos diferentes equipados con columnas de distinta polaridad, a fin de recoger IRs en dos fases:

3.4.1.2.1. GC-O con columna polar (DB-WAX)

Se usó un cromatógrafo de gases GC Trace de ThermoQuest con un divisor de flujo a la salida de la columna conectado a un detector de ionización de llama (FID) y a un puerto olfatométrico en el que estaba situado el juez. Este cromatógrafo disponía de una columna DB-WAX (se trata de una columna polar) de Agilent technologies de longitud 30 m x 0,32 mm (diámetro interno) x 0,5 μm (espesor de fase), precedida por una precolumna de 3 m x 0,32 mm. El gas portador empleado fue el H_2 con flujo de 3 mL/min. Se inyectó en la columna 1 μL de los extractos de manera manual. Se trabajaba con el inyector en modo Splitless y a una temperatura de 250 $^\circ\text{C}$. El horno cromatográfico siguió el siguiente programa de temperaturas; primero 40 $^\circ\text{C}$ durante 5 minutos, tras ello se fue aumentando hasta los 100 $^\circ\text{C}$ con una rampa de temperaturas de 4 $^\circ\text{C}/\text{min}$ y finalmente se aumentó hasta los 220 $^\circ\text{C}$ con una rampa de 6 $^\circ\text{C}/\text{min}$, temperatura a la que se mantuvo unos 10 minutos. Al final de la columna había dispuesto un divisor de flujo que dividía éste 50% al detector (FID) que trabajaba a una temperatura de 250 $^\circ\text{C}$ y el otro 50% al puerto olfatométrico, donde era evaluada por un juez. Se usó una resistencia para evitar la condensación de algunos compuestos en el puerto olfatométrico y un humidificador para que no se secase la nariz del juez durante la olfatometría. El programa de temperaturas empleado en el cromatógrafo se ejecutaba desde el ordenador usando el software Chrom-Card. (Anexo 2a)

3.4.1.2.2. GC-O con columna apolar (VF-5ms)

El extracto se inyectó también en un segundo cromatógrafo de gases de la serie GC-8000 de Fisons instruments (FIGURA 7), equipado con una columna VF-5ms (apolar), de Varian, de dimensiones 30 m (longitud) x 0,32 mm (diámetro interno) x 1 μm (espesor de fase). El gas portador que se empleó era idéntico al caso anterior con un flujo igual, el modo de trabajo también fue similar, con el mismo programa de temperaturas. Se usó una resistencia y un humidificador al igual que en el caso anterior. El programa de temperaturas empleado en el cromatógrafo se ejecutaba desde el ordenador usando el software WCC-MAIN. (Anexo 2b)



Fig. 7. Cromatógrafo de gases con columna VF-5ms y puerto olfativo.

3.4.2. Cromatografía de gases – Espectrometría de masas (GC-MS)

Para intentar identificar algunas de las moléculas de los extractos analizados, se inyectaron 2 µL del extracto en un cromatógrafo Varian 450-GC de Varian, acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas Saturn 2200 también de Varian. La columna que se usó en este cromatógrafo era DB-WAX UI de Durabond, de longitud 60 m x 0,25 mm (diámetro interno) x 0,25 µm (espesor de la fase).

Se inyectó en Splitless; alcanzado el minuto 2 y 20 segundos se activaba el modo Split con una relación de 1/20; y en el minuto 5 el Split pasaba a modo ahorro, siendo la relación de Split de 1/10. El equipo posee un inyector de temperatura programable (PVT) por lo que la inyección se realizó en frío (40 °C), subiéndose la temperatura del inyector a 200 °C/min hasta llegar a 300 °C. El flujo de la columna era 1,5 mL/min y el gas portador que se usó fue Helio. El programa de la temperatura del horno fue el siguiente: se partía de la temperatura del horno a 35 °C hasta el minuto 3 que es cuando se empezaba a aumentar la temperatura hasta 220 °C con una rampa de temperaturas de 2 °C/min (duración de 92 min 30 seg), seguidamente una vez se alcanzaba la temperatura de 220 °C la temperatura ascendía hasta los 240 °C con una rampa de 20 °C/min (duración 1 min.); por último a la temperatura de 240 °C permanecía el horno durante 60 min. El espectrómetro de masas iba adquiriendo datos desde el minuto 11 (cuando acababa de salir el disolvente) hasta el 156 (aproximadamente cuando el horno terminaba) realizando un barrido m/z desde 45-320. Se realizaron 3 inyecciones; uno para el extracto de la borraja cruda; uno para el agua de la borraja y finalmente uno para los alcanos cuyos tiempos se usarían de referencia para determinar sus IR (índices de retención).

Para comprobar la identidad de los diversos picos del cromatograma y de sus espectros obtenidos se hacía uso de la biblioteca NIST que se encontraba incorporada en el programa que se usaba con el espectrómetro de masas (Anexo 2c).

3.5. Tratamiento de datos.

3.5.1. Cálculo del índice de retención

Para poder identificar mediante cromatografía los diversos compuestos olorosos de la muestra, es preciso realizar el cálculo del índice de retención de cada uno de los compuestos detectados. Para ello se emplea una disolución de alcanos n-lineales como referencia (C7-C30); empleando el mismo programa empleado en las olfatometrías.

La ecuación que relaciona los tiempos de elución de nuestros compuestos con la de los alcanos para calcular el índice de retención es la siguiente ^[8,17]:

$$I = 100 \left[Z + \frac{t_{Ri} - t_{RZ}}{t_{R(Z+1)} - t_{RZ}} \right]$$

Donde z corresponde al número de carbonos del alcano; t_{Ri} es el tiempo en el que se detecta el olor de la molécula fragante; t_{Rz} es equivalente al valor del tiempo del alcano anterior al del tiempo de la molécula olorosa y $t_{R(z+1)}$ es el alcano posterior.

Este IR será diferente cuando la muestra haya sido inyectada en un cromatógrafo con una columna con fase estacionaria diferente, por lo que en nuestro caso disponemos de los índices de retención de los compuestos en columna polar (DB-WAX) y apolar (VF-5ms).

5.1.1. Cálculo de la frecuencia modificada (% FM)

Este parámetro se emplea en la GC-O para decidir qué zonas de olor son relevantes en el estudio y cuáles no, ya que sólo aquellas zonas de olor con FM (%) > 30% se pueden considerar relevantes.

La fórmula usada para determinar dicho valor es la siguiente [6]:

$$FM(\%) = \sqrt{F(\%) * I(\%)}$$

Donde F (%) corresponde a la frecuencia con la que se ha oído cierta molécula por parte de los panelistas expresado en forma de porcentaje (si son 6; 3/6 correspondería a un 50%), y la I (%) va referido a la intensidad con la que se ha oído la molécula (siendo el máximo 6 personas, y la intensidad máxima 3, si todos lo huelen a una intensidad de 1,5 la I (%) equivaldrá al 50 %).

Por lo tanto las moléculas con un valor de FM (%) inferior al 30 % no se consideran en el perfil olfativo.

4. Resultados y discusión

El estudio del aroma de la borraja se considera pionero en este campo, ya que no se han encontrado estudios previos sobre este alimento. Debido a su novedad, fue necesario llevar a cabo la optimización de ciertos aspectos, preferentemente sobre la preparación de la muestra, cuyos resultados se explicaran a continuación.

4.1. Preparación del extracto

Se decidió estudiar en este TFG la borraja, y más concretamente la borraja cruda y la borraja cocida. En este último caso fue fundamental el estudio del aroma remanente en el agua de cocer la borraja.

4.2. Metodología de extracción

4.2.1. Tiempo De Purga

Al flujo de nitrógeno escogido, el tiempo máximo de purga al cual comenzaban a perderse aromas en el cartucho de retención fue de 30 min.

4.2.2. Tiempo De Cocción

Siguiendo las especificaciones del fabricante de la olla, se estableció que el tiempo de cocción de la borraja fuera de 10 min. No fue posible realizarlo en el laboratorio, porque no era posible calentar la borraja en una olla a presión con las placas calefactoras de las que se disponía. Se realizó el extracto en una placa vitrocerámica. Para llevarlo al laboratorio se echaron las borrajas con un poco de agua en uno de los 3 frasco pyrex de 1 L que se usaron para llevar agua milli-Q, y otro de los frasco pyrex se usó para llenarlo con el agua de cocer la borraja, esos frascos se llevaron en bolsas de plástico hasta el laboratorio, como fue un día ventoso y algo frío, los botes se mantuvieron frescos no afectando a los volátiles, y tan solo se tardó unos 7 minutos en llegar al laboratorio una vez se acabó de llenar los frascos.

4.2.3. Concentración del extracto

Una vez obtenidos los extractos, se debía comprobar si era necesario concentrarlos. Para determinar esto, se olieron los extractos en el sistema GC-O con el fin de ver si alguno de los compuestos olorosos se encontraba ya saturado (valor de intensidad de 2,5-3), lo que indicaría que no habría que concentrar dicho extracto. Por el contrario, si los valores de intensidad de los olores se encontraban todos por debajo de 1 era indicativo de que era necesario concentrar el extracto. Los extractos de borraja cruda y de borraja cocida fueron concentrados hasta 200 μ L. En este último caso, incluso tras la concentración no se consiguió intensidad aromática suficiente, por lo que se empleó el extracto realizado sobre el agua de cocción como muestra a estudio para la borraja cocida.

4.3. Tabla de resultados de olfatometría

En la Tabla 1 se pueden observar las distintas moléculas que se han conseguido identificar en cada una de las muestras con sus respectivos valores de FM (%), sus IRs en ambas columnas, y con los descriptores aromáticos correspondientes.

Mediante la inyección en los extractos en el GC-MS, se ha conseguido realizar una aproximación sobre los diferentes compuestos que pueden formar parte del aroma de la borraja.

El cruce de datos de índices de retención de ambas columnas, descriptores y espectros de masas, así como la búsqueda en diferentes páginas como Pherobase y Flavornet han permitido proponer la identidad de algunas de las diferentes moléculas olorosas de la borraja. Las identidades propuestas tienen diversos niveles de confianza:

- a) Si todos los datos experimentales del odorante (IRs en las dos fases, olor y espectro de masas) coinciden con los reportados en las bases de datos internas o externas.
- b) Los datos experimentales de IRs en las dos fases y el olor coinciden con los reportados en las bases de datos internas o externas. No se ha conseguido un buen espectro de masas del odorante, en general por tratarse de moléculas presentes en muy bajas concentraciones.

- c) Tan solo se dispone de coincidencia en el IR en la fase principal (DB-WAX) y en el olor. El olor no pudo percibirse claramente en la fase no polar, en la que probablemente coelúa con otro más potente que lo enmascaró.

En cualquier caso, y dado que no se ha dispuesto de tiempo para confirmar los datos experimentales obtenidos con los de los patrones químicos puros, las identidades deben considerarse como no definitivas.

Tabla 1. Zonas de olor detectadas en el perfil aromático de las muestras con la identificación molecular más probable. Los datos se dan ordenados por índice de retención en la columna polar.

Índice de retención		Olor	Frecuencia modificada (FM%)		Identificación más probable
DB-WAX	VF-5ms		Cruda	Cocida	
1306	981	Champiñón, metal	82	82	1-octen-3-ona ^b
1345	928	Palomitas, fritos, pan tostado		83	2-acetil-1-pirrolina ^b
1380	984	Moho, geranio punzante, frutos secos, base para colonia, metálico, tierra, patata cocida, vegetal, fruta deshidratada	82	93	Z-1,5-Octadien-3-ona ^b
1444	1093	Verdura cocida con patata, tallo de flor, especiado agradable balsámico, menta, cacahuete, terroso	83		2-Isopropil-3-metoxipirazina ^b
1462	914	Patata cocida, queso, crema, acelga,		79	Metional ^b
1464	984	Queso, champiñón	53		1-octen-3-ol ^a
1497	1159	Champiñón, terroso, herbal, patata cocida, menta	57		2,3-dietil-5-metilpirazina ^b
1512	1154	Papel, cartón, verdura cocida, insectos, tierra, cloro, humedad.	19	68	Z-2-nonenal ^b
1536	1167	Vegetal, medicina, almendra amarga.	87		E-2-nonenal ^b
1545		Plástico, disolvente-metal, verde	31	27	Z-4-decenal ^c
1594		Dulce, flor, vegetal, pino, cosméticos, grasa láctica	31	56	β -cariofileno ^c
1651	1046	Miel, floral, cítrico, colonia, crema	14	39	2-fenilacetaldehído ^b
1732	1170	Especiado sucio cocido, jabón, regaliz negro, menta, verdura cruda, cítrico aceite de masaje, fruta.	67	57	E-2-nonen-1-ol ^b
1781	1183	Verdura cruda, pepino-cloro,	41		(E,Z)-2,6-nonadien-1-ol ^b
1875	1095	Medicinal, urea, aceite de frutos secos,	26	73	Guaiacol ^b

		especiado tostado, viejo, floral.			
2019		Terroso, verdura cocida, metálico, humedad, cloro, herbáceo, pan, plástico, quemado, jabón	36	73	<i>n.i. 2019</i>
2054	1061	Fresa, caramelo, dulce tostado, pan tostado, especiado		78	Furaneol ^b
2080		Verdura cocida, clorado, metálico, cítrico, sucio		31	<i>n.i. 2080</i>
2117	1613	Floral, vegetal		31	10 epi y eudesmol ^b
2143	1463	Dulce, especiado		38	Cinamato de etilo ^b
2181	1415	Menta, dulce, especiado		53	<i>n.i. 2181</i>
2207	1174	Maloliente, insecticida, animal, especie química, secante		53	4-etilfenol ^b
2222	1318	Ahumado, café, especiado, medicinal, agradable dulce		51	2-metoxi-4-vinilfenol ^a
2231		Cachimba, especias, regaliz, anís.		41	Sotolón ^c
2249		Floral, frutos secos, cloro, dulce, especiado		51	β -sinensal ^b
n.i. compuesto no identificado					
^a Identificación mediante los descriptores aromáticos, IR (DB-WAX y VF-5ms) y MS					
^b Identificación mediante los descriptores aromáticos, IR (DB-WAX) e IR (VF-5ms)					
^c Identificación mediante los descriptores aromáticos e IR (DB-WAX)					

Como puede observarse en la tabla, se detectaron un total de 25 zonas de olor diferentes: 14 en el extracto de la borraja cruda y 20 en el agua de la borraja cocida. De acuerdo con los criterios comúnmente aceptados en química del aroma, se ha podido establecer la identidad de manera inequívoca de tan sólo 2 moléculas, ya que se pudo visualizar claramente el espectro de masas del 1-octen-3-ol y del 2-metoxi-4-vinilfenol al tiempo de retención correspondiente.

El uso de los tiempos de retención en las dos columnas permite proponer la identificación más probable de otros, que son la 1-octen-3-ona, la 2-acetil-1-pirrolina, la Z-1,5-Octadien-3-ona, el 2-isopropil-3-metoxipirazina, el metional, la 2,3-dietil-5-metilpirazina, el Z-2-nonenal, el E-2-nonenal, el 2-fenilacetaldehído, el E-2-nonen-1-ol, el (E,Z)-2,6-nonadien-1-ol, el guaiacol, el furaneol, el 10-epi- γ -eudesmol, el cinamato de etilo y el 4-etilfenol. Aunque no pueden considerarse definitivas hasta no visualizar los espectros de masas en un extracto más concentrado, que no pudo ser analizado por falta de tiempo, se trata de identificaciones en algunos casos muy probables, ya que coinciden los dos índices de retención y el olor característico de la molécula. La identidad de otros tres componentes se proponen con base tan sólo en el IR y el olor. No se ha podido proponer candidato alguno para 3 odorantes, uno de ellos alcanzando alta puntuación en el extracto de borraja cocida, el n.i. 2019, con un olor terroso-metálico y otros dos con una puntuación más baja; el n.i. 2080, y el n.i. 2181.

Las moléculas cuyas identidades se proponen, pertenecen a las familias de aldehídos y cetonas alifáticas, alcoholes alifáticos y aromáticos, derivados de la pirazina, lactonas, ésteres alifáticos, un tioéter, pirrolina y un sesquiterpeno bicíclico. Siendo los alcoholes y los carbonilos los grupos de mayor FM (%) por lo tanto a priori los de mayor relevancia en el perfil olfatométrico de la borraja.

El olor de la borraja cruda parece venir dominado por cuatro olores principales, todos ellos con puntuaciones olfatométricas superiores a 80:

- 1) El olor metálico-champiñón de la 1-octen-3-ona.
- 2) El olor metálico-geranio de la Z-1,5-Octadien-3-ona
- 3) El olor terroso de la 2-isopropil-3-metoxipirazina.
- 4) El olor vegetal del E-2-nonenal.

Y por un quinto menos intenso, con una puntuación de 67 que es el olor vegetal del E-2-nonen-1-ol. El resto de odorantes de la borraja cruda tienen puntuaciones olfatométricas por debajo de 60 y no parecen añadir descriptores aromáticos no cubiertos por los cinco anteriores, por lo que probablemente tendrán una participación secundaria.

El olor del agua de cocer borrajas es mucho más complejo, ya que está integrado por al menos 8 odorantes con puntuaciones superiores al 65%. Entre estos odorantes se encuentran compuestos con descriptores sensoriales muy diferentes.

- 1) El olor metálico-champiñón de la 1-octen-3-ona.
- 2) El olor de palomitas-fritos de la 2-acetil-1-pirrolina.
- 3) El olor metálico-geranio de la Z-1,5-octadien-3-ona.
- 4) El olor a patata cocida del metional.
- 5) El olor medicinal-especiado del guaiacol.
- 6) Un olor herbáceo-terroso-clorado cuya identificación no ha sido posible (detectado a IR 2019).
- 7) El olor de algodón de azúcar del furaneol.
- 8) El olor a papel-cartón-vegetal-clorado del Z-2-nonenal.

Es además de destacar que en este extracto se han detectado hasta 6 odorantes más con puntuaciones por encima del 50%: el β -cariofileno, el 4-etilfenol, el 2-metoxi-4-vinilfenol, el β -sinensal, el sotolón y un compuesto no identificado con índice 2181 y descriptores de menta.

La mayor complejidad puede ser atribuida tanto a la creación de nuevos aromas en el proceso de cocción como a la diferente metodología de extracción empleada. Compuestos típicos formados en procesos térmicos son la 2-acetilpirrolina, el metional o el furaneol; lo que explicaría que estos componentes se encuentren solo en la muestra cocida. Se observan también incrementos debido a la concentración de los volátiles en el agua de borraja como el Z-2-nonenal (% FM cruda 19 y % FM cocida 68) que tiene mayor FM (%) en el agua de borraja que en la borraja cruda. Seguramente estos compuestos derivan de ácidos grasos, aunque sus % FM son diferentes porque en ambas muestras las reacciones que se den, serán distintas. Lo

más probable es que en la borraja cruda se den, principalmente, reacciones de tipo enzimático, mientras que en la borraja cocida serán principalmente reacciones térmicas (oxidativas, también de Maillard,...)

Resulta también obvio que algunos de los odorantes más importantes del producto crudo no sobreviven al proceso de cocción. Este es el caso tanto del E-2-nonenal, que es un subproducto de la oxidación catalizada enzimáticamente de los ácidos grasos, y de la 2-isopropil-3-metoxipirazina, que es un producto característico de olores vegetales pero que es térmicamente lábil.

Por otra parte, la extracción en fase sólida directa empleada en el agua de borraja produce extractos más complejos, ya que extrae todos los volátiles presentes en el agua de borraja, independientemente de su volatilidad. Sin embargo, en los extractos obtenidos por P&T, solo aquellos compuestos con alta volatilidad y facilidad de transferencia a la fase vapor (transferencia de materia) son arrastrados y acabarán retenidos en el cartucho.

La mayoría de los compuestos con descriptores verdes son compuestos que se encuentran en los perfiles olfatométricos de muchos vegetales. En estudios realizados en la miel de cardo, se han encontrado moléculas como el 1-octen-3-ol, y el 2-fenilacetaldehído [18]. El 2-fenilacetaldehído también se encuentra en la col mofeta [19]. Otro ejemplo se encuentra en estudios sobre el aroma de las espinacas, donde se han llegado a identificar el 2-fenilacetaldehído, el (E,Z)-2,6-nonadien-1-ol y el E-2-nonenal [20]. También en la achicoria se ha identificado como una de las moléculas olorosas el 2-fenilacetaldehído, pero la 1-octen-3-ona es otra de las moléculas que forma parte del perfil aromático de la achicoria además de en la borraja [21]. El β -cariofileno es un compuesto con un descriptor vegetal que se encuentra además de en la borraja en el apio [22].

5. Conclusiones

En este TFG se ha abordado el estudio de la borraja mediante la aplicación de la técnica GC-O con ayuda de la técnica de GC-MS.

Terminado el TFG se pueden sacar ciertas conclusiones de los datos.

- a) Mientras que empleando la técnica de purga y trampa ha sido posible obtener un extracto aromáticamente intenso (tras concentración) de la borraja cruda, esto no fue posible en el caso de la borraja cocida, lo que implica que el olor de ésta es más sutil que el de la borraja cruda debido, probablemente, a la más difícil transferencia de volátiles desde la matriz fibrosa y a la destrucción de los sistemas enzimáticos activos en la borraja cruda responsables de la emisión de los odorantes.
- b) No obstante, ha sido posible obtener un extracto del agua de cocer borrajas mediante SPE directa.
- c) Los 5 odorantes con mayor responsabilidad potencial en el aroma de la borraja cruda son la 1-octen-3-ona, la Z-1,5-octadien-3-ona, la 2-isopropil-3-metoxipirazina, el E-2-nonenal y el E-2-nonenol.

- d) El perfil olfatométrico se altera totalmente durante la cocción, desapareciendo dos de los odorantes más intensos de la borraja cruda (E-2-nonenal y 2-isopropil-3-metoxipirazina) y generándose una serie compleja de odorantes como son la 2-acetil-1-pirrolina, el metional, el furaneol, el guaiacol y el Z-2-nonenal.
- e) Debe recordarse que debido a la escasez de tiempo, gran parte de las identificaciones no pueden considerarse definitivas, aunque sean muy probables. Para ello, deberíamos conseguir extractos más concentrados que nos permitieran obtener espectros de masas claros y comparar todos los datos obtenidos *in situ* con patrones puros.

Finalmente, como conclusión formativa, cabe destacar que con la realización de este TFG, he aprendido las técnicas usadas para caracterizar los aromas de los alimentos, el uso de bibliografía, he adquirido práctica en cómo realizar una memoria sobre un trabajo científico, tanto es sus aspectos formales como en los más prácticos de presentar y discutir los resultados y llegar a formar conclusiones.

6. Bibliografía

LIBROS:

1. Wüst, M. Biosynthesis of Plant-Derived Odorants, Handbook of odor. Springer International Publishing: Switzerland, 2017.
2. Leiz, K. 1460 recetas para disfrutar las verduras de muchas maneras, zahorí de Ideas S.L.: Eslovenia, 2012.
3. Ferreira, V. Cromatografía: Fundamentos y Práctica, Universidad de Zaragoza: Zaragoza, 2007.
4. Gross, J.H. Mass spectrometry: A textbook, Springer: Alemania, 2004.
5. Ettre, L.S. and. Hinshaw, J.V Basic relationships of gas chromatography. Advanstar, Cleveland, USA; 1995, 18(3), 190.
6. Dravnieks A., Atlas of Odor Characteristics Profiles. ASTM, Data Series 61, Philadelphia, 1985.

REVISTAS:

7. Malnic, B.; Hirono, J.; Sato, T.; Buck, L.B. Combinatorial Receptor Codes For Odors. *Cell*. **1999**, *95*(5), 713-723.
8. Van Ruth, S.M., Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomol. Eng.* **2001**, *17*(4-5), 121-128.
9. Börsch, A. Small molecules make scents, *Science in school*. **2007**, *6*, 69-74.
10. Abad Alegría, F., La borraja no es una verdura tan aragonesa como se cree. *Heraldo de Aragón*, **2015**.
11. Martínez Urtasum, J.M. La borraja, reina de la huerta aragonesa. *La magia de Aragón*. **2005**, *15*(14), 94-99.

12. Wettasinghe M.; Shahidi, F.; Amarowicz, R., Abou-Zaid, M.M. Phenolic acids in defatted seeds of borage (*Borago officinalis* L.). *Food chem.* **2001**, *75*(1), 49-56.
13. Mondello, L.; Beccaria, M.; Donato, P.; Cacciola, F.; Dugo, G.; Dugo, P. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the analysis of triacylglycerols in *Borago officinalis*. *J. S. Sci.* **2011**, *34*(6), 688-692.
14. Dodson, C.D. and Stermitz, F.R. Pyrrolizidine alkaloids from borage (*borago officinalis*) seeds and flowers. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*(4), 727-728.
15. Pet'ka, J.; Ferreira, V.; Cacho, J. Posterior evaluation of odour intensity in gas chromatography-olfactometry: comparison of methods for calculation of panel intensity and their consequences. *Flavour Fragrance J.* **2005**, *20*, 278-287.
16. Delahunty, C.M.; Eyres, G.; Dufuor, J.P. Gas chromatography-olfactometry. *J. S. Sci.* **2006**, *29*, 2107-2125.
17. Yiliang, S.; Ruiyan, Z.; Qingqing, W.; Bingjiu, X. Programmed-temperature gas chromatographic retention index. *J. Chromatogr. A.* **1993**, *657*(1), 1-15.
18. Bianchi, F.; Mangia, A.; Mattarozzi, M.; Musci M. Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food chem.* **2011**, *129*, 1030-1036.
19. Miyazawa, M.; Nakahashi, H.; Kashima, Y.; Motooka, R.; Hara, N.; Nakagawa H.; Yoshii, T.; Usami, A.; Marumoto, S. Chemical composition and aroma evaluation of essential oils from skunk cabbage (*Symplocarpus foetidus*). *J. Oleo Sci.* **2015**, *64*(12), 1329-1336.
20. Näf, R. and Velluz, A. The volatile constituents of extracts of cooked spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). *Flavour Fragrance J.* **2000**, *15*, 329-334.
21. Baek, H.H. and Cadwallader, K.R. Roasted chicory aroma evaluation by gas chromatography mass spectrometry olfactometry. *J. Food. Sci.* **1998**, *63*(2), 234-237.
22. Deng, C.; Song, G.; Zheng, X.; Hu, Y.; Zhang, X. Analysis of the volatile constituents of *Apium graveolens* L. and *Oenanthe* L. by gas chromatography-mass spectrometry, using headspace solid-phase microextraction. *Chromatographia.* **2003**, *57* (11-12), 805-809.

PÁGINAS WEB:

23. Colorado, R. and Rivera, J. M. Olor a química. <https://www.uv.mx/cienciauv/blog/quimicadelolor/>
24. http://www.flavornet.org/f_kovats.html
25. <http://www.pherobase.com/>

ANEXOS

1. Fórmulas

a. Volúmenes muertos de los lechos de extracción.

Los volúmenes muertos corresponden a un volumen igual al 45-50 % del volumen de la columna que contiene la resina. Dado que el diámetro de la columna era de 0,58 cm \rightarrow (radio de 0,29 cm); y la altura de la columna de la resina era de 1 cm, el volumen muerto del sistema era:

$$V (45 - 50\%) = \pi * 0,29^2(\text{cm}^2) * 1 (\text{cm}) = 0,264 \text{ cm}^3$$

$$\text{Volumen muerto (50\%); se usa el 50 \%} = 0,264 * 0,5 = 0,132 \text{ cm}^3$$

Se lava con 4 volúmenes muertos $\rightarrow 0,132 * 4 = 0,528 \text{ cm}^3$ es el volumen total de lavado del cartucho.

2. Espectros y cromatogramas

a. Cromatogramas de DB-WAX (empleando FID como detector).

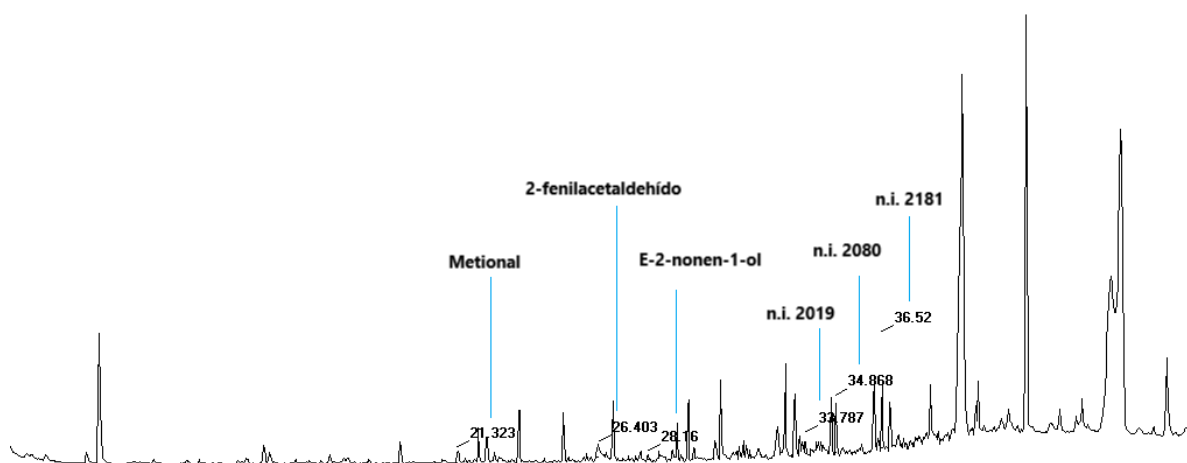


Fig. 8. Cromatograma del agua de borraja.

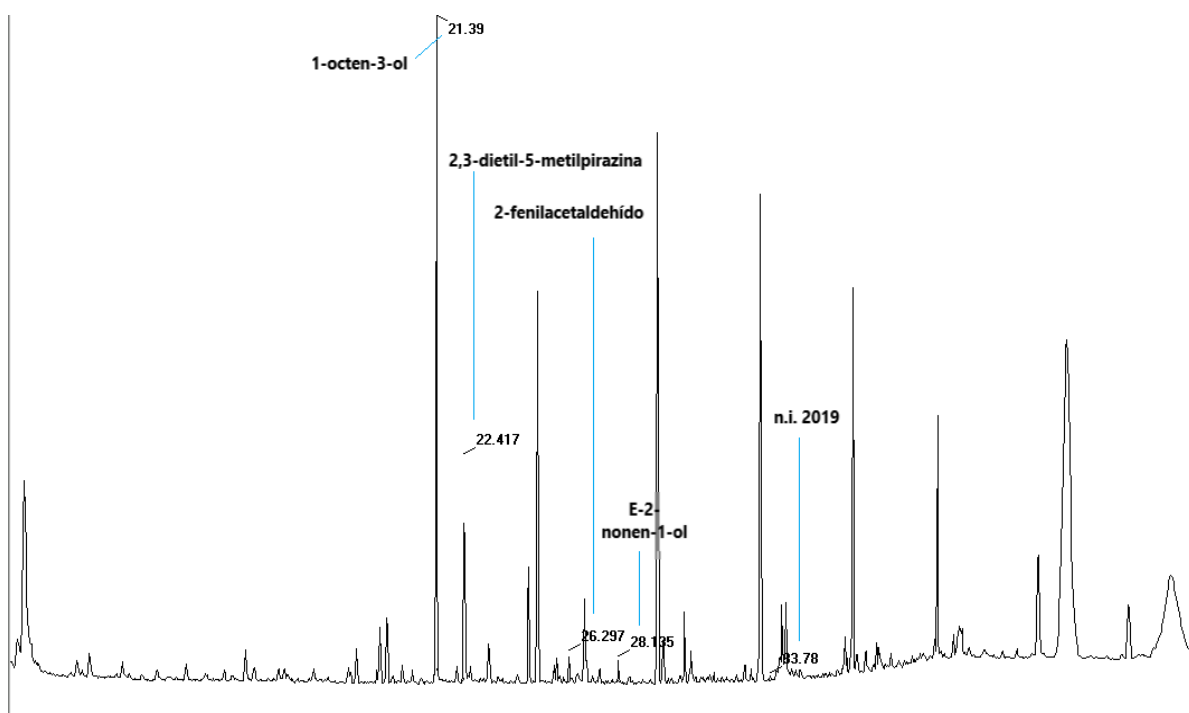


Fig. 9. Cromatograma de la borraja cruda.

b. Cromatogramas de VF5-ms

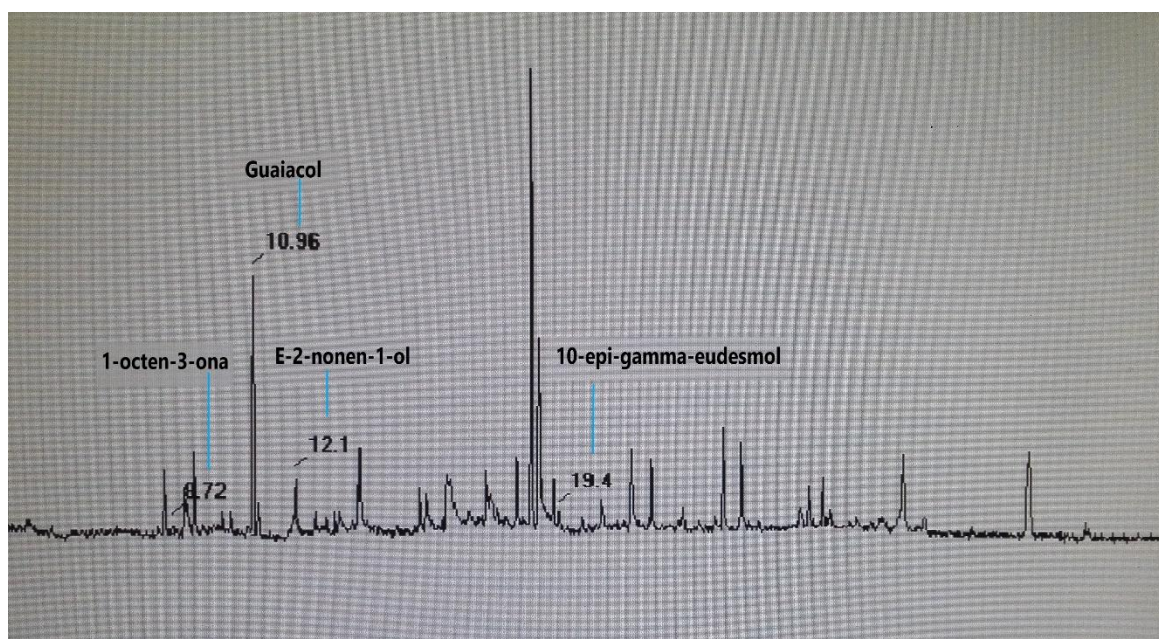


Fig. 10. Cromatograma del agua de borraja.

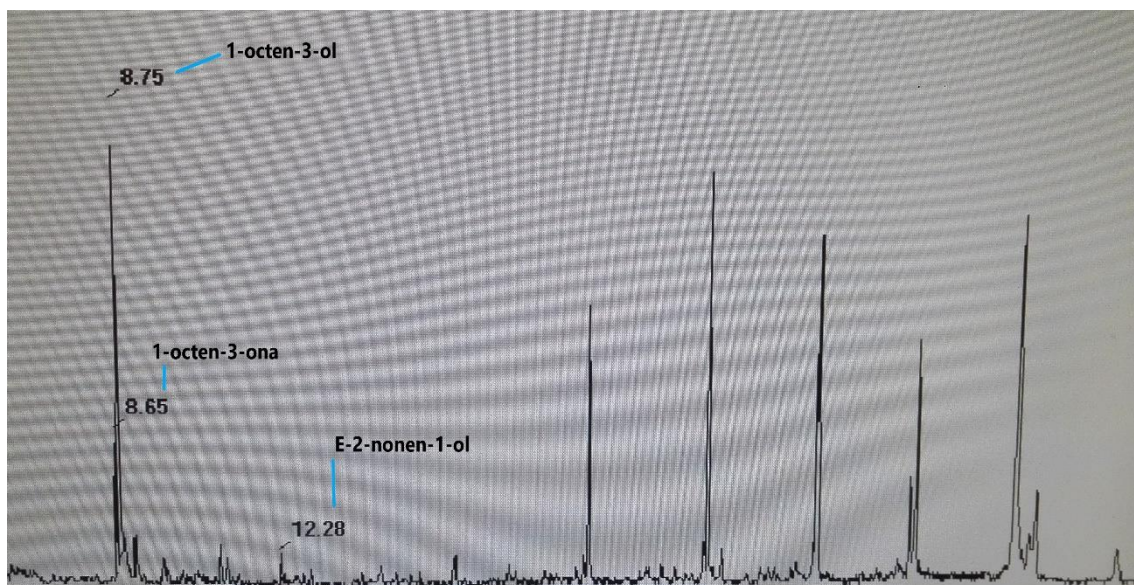


Fig. 11. Cromatograma de la borraja cruda.

c. Espectros de GC-MS

i. 2-metoxi-4-vinilfenol

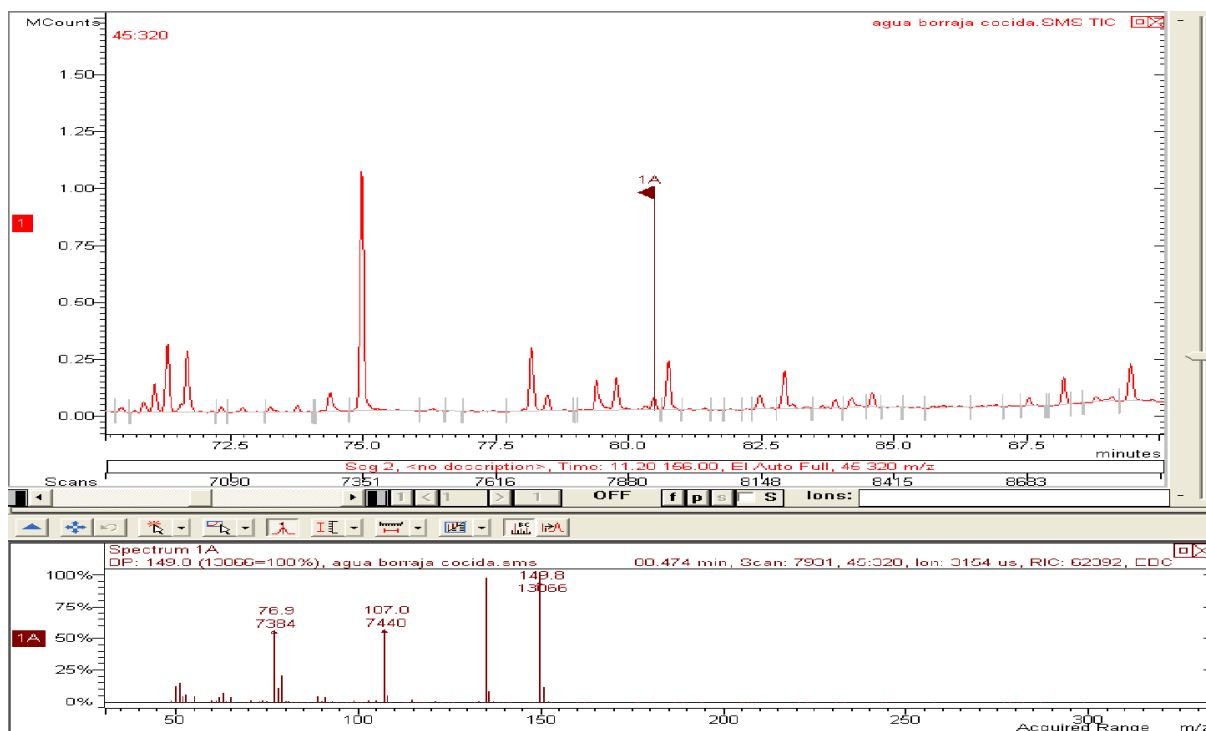


Fig. 12. Espectro del agua de borraja marcando el pico que identifica la molécula.

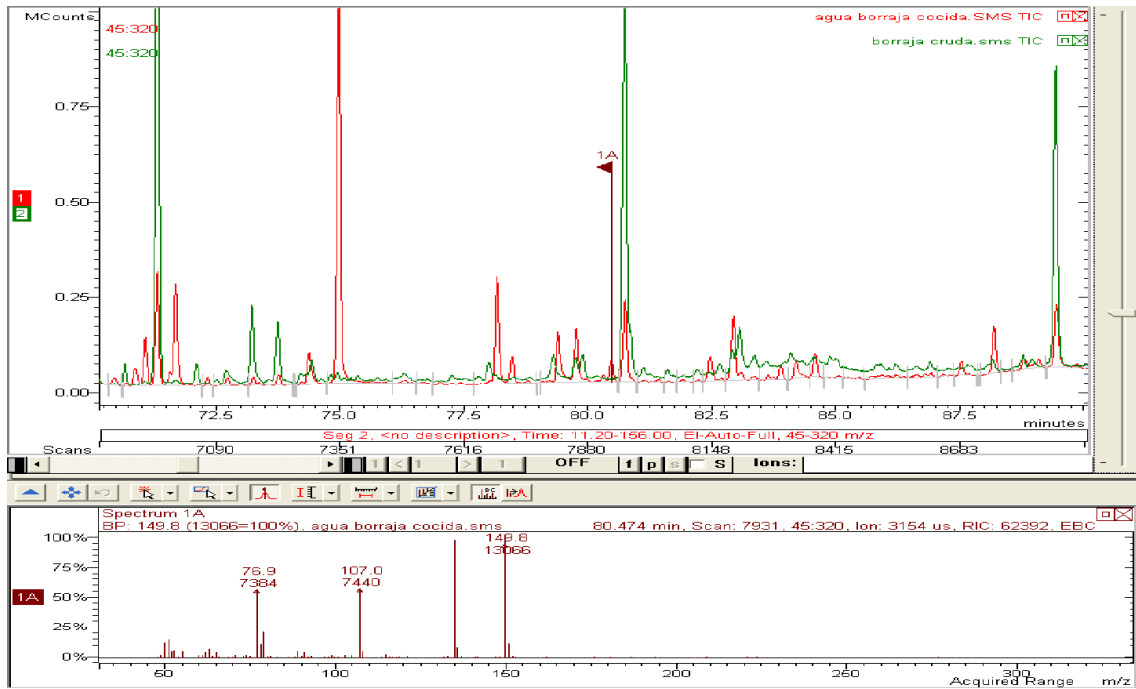


Fig. 13. Cromatogramas de ambos extractos demostrando que la molécula se encuentra solo en el agua de la borraja.

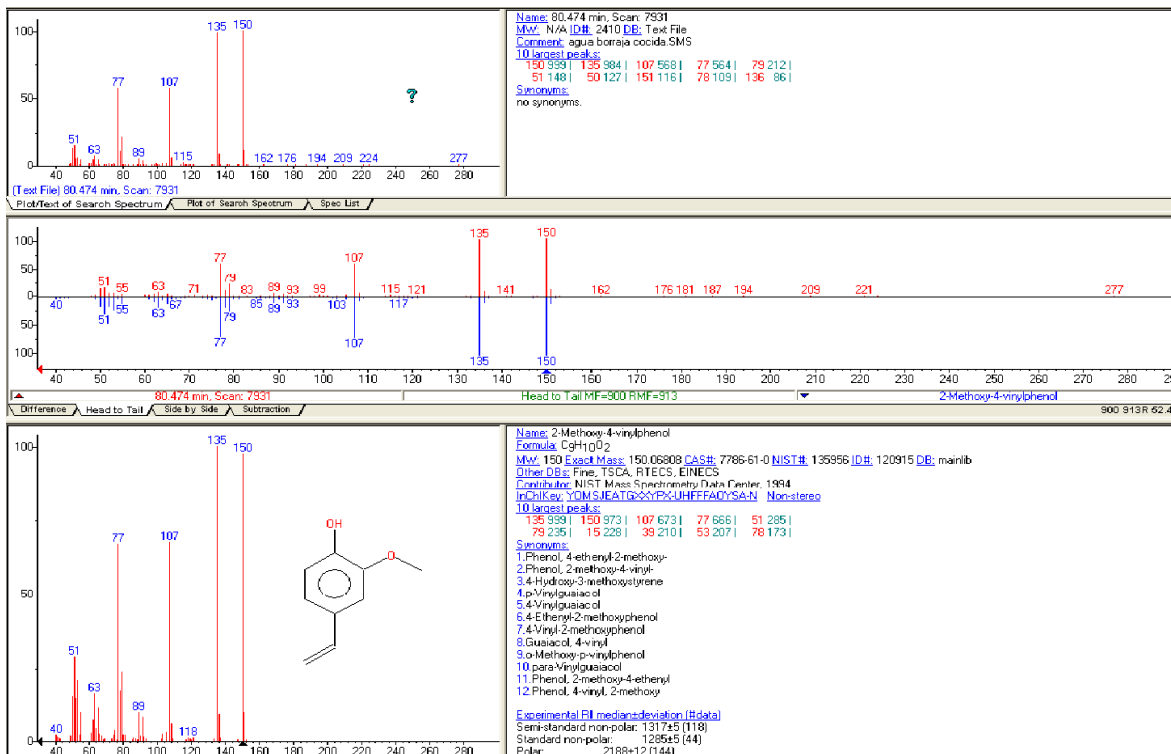


Fig. 14. Identificación de la molécula con ayuda de la biblioteca NIST.

ii. 1-octen-3-ol

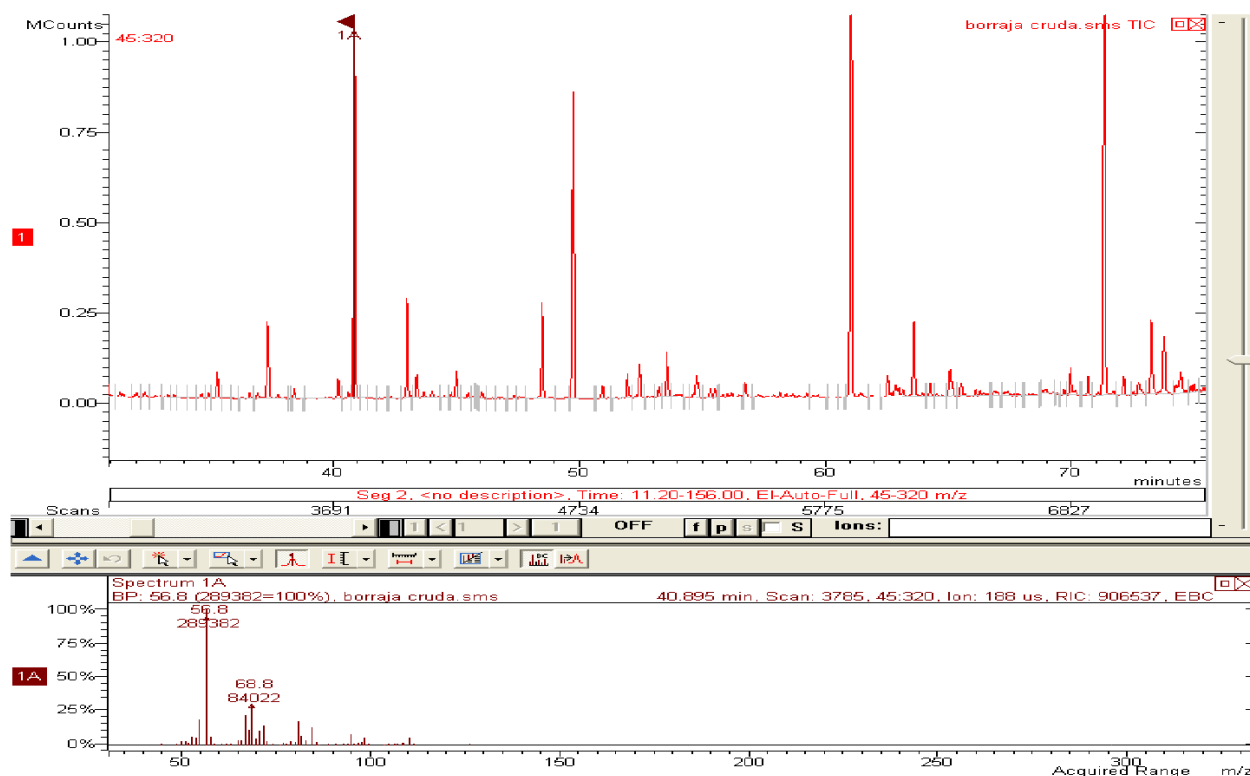


Fig. 15. Espectro de la borraja cruda marcando el pico que identifica la molécula.

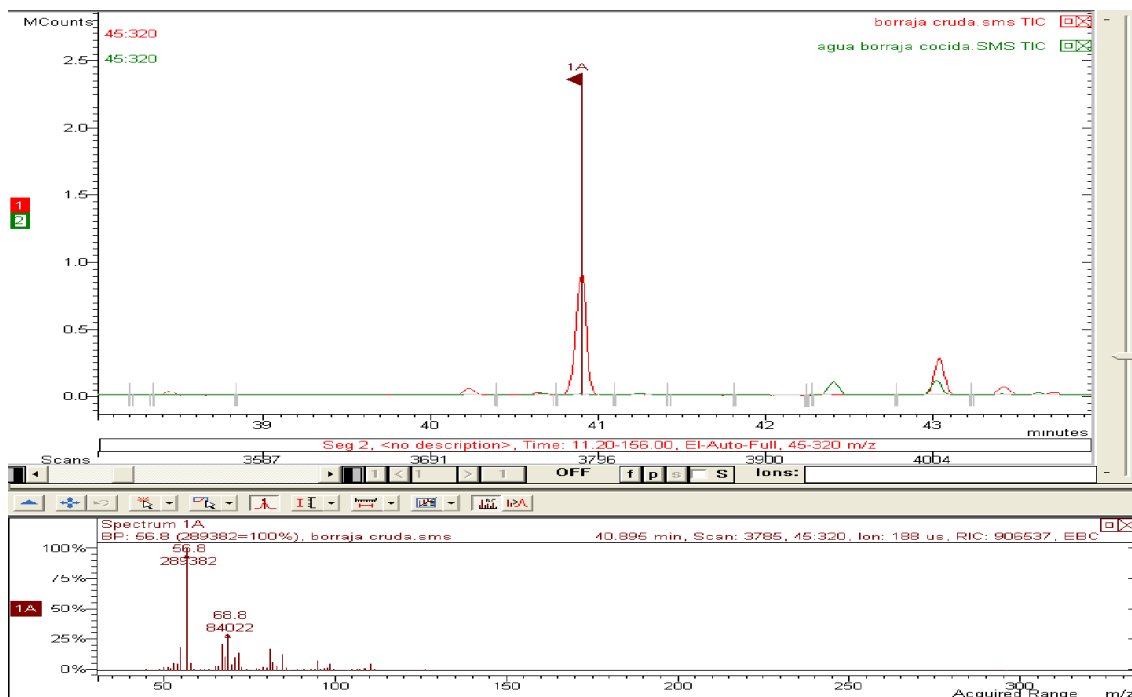


Fig. 16. Cromatogramas de ambos extractos demostrando que la molécula se encuentra solo en la borraja cruda.

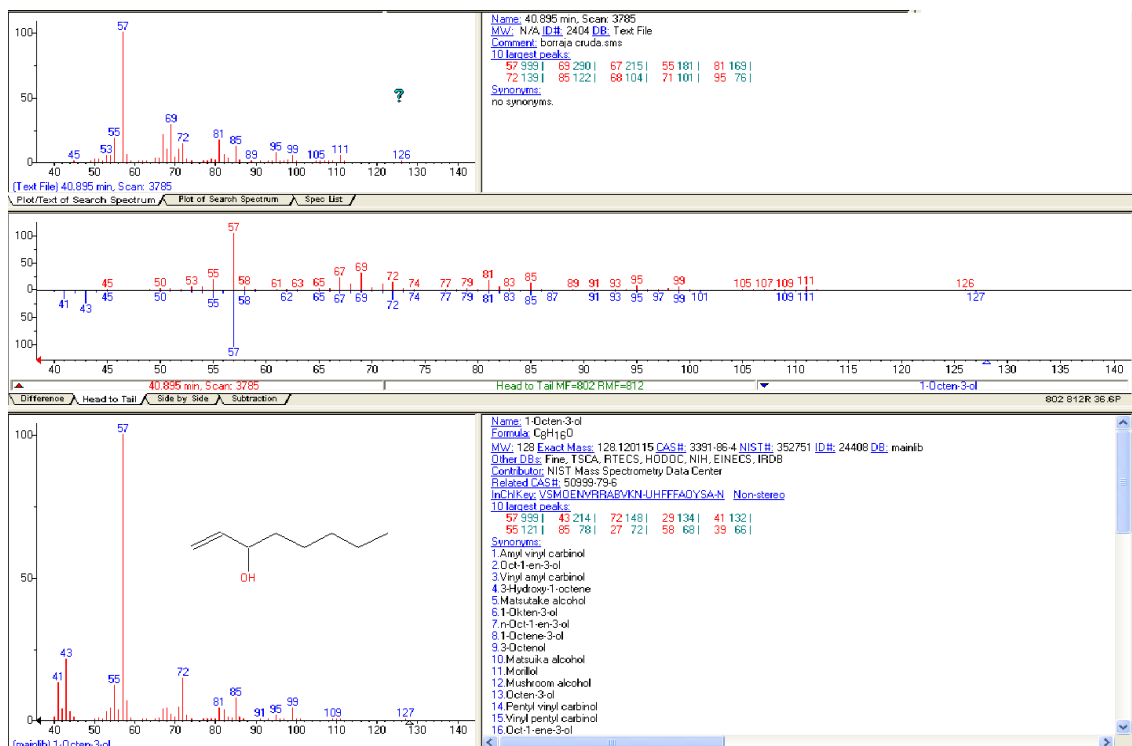


Fig. 17. Identificación de la molécula con ayuda de la biblioteca NIST.

3. Tabla de abreviaturas

Abreviatura	Palabra
GC	Cromatografía gas
GC-O	Cromatografía gas-olfatometría
GC-MS	Cromatografía gas- espectrometría de masas
cm	Centímetro
μL	Microlitro
IR	Índice de Retención
m/z	Masa/carga
EI	Impacto electrónico
mL	Mililitro
PP	Polipropileno
PE	Polietileno
μm	Micrómetro

min	Minuto
mg	Miligramo
L	Litro
g	Gramo
P&T	Purga y trampa
N ₂	Nitrógeno
FM	Frecuencia modificada
FID	Dectector de ionización de llama
PVT	Inyector de temperatura programable
SPE	Extracción en fase solida
n.i.	No identificado