



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Desarrollo de una metodología cuantitativa para el análisis del aroma potencial de la manzana mediante el estudio de sus precursores hidrolizados

Development of a quantitative methodology for the analysis of apple aroma potential through the study of its hydrolysed precursors.

Autor/es

Irene Esther Bartolomé Castillo

Director/es

Arancha de la Fuente Blanco  
Mónica Bueno Fernández

Facultad de Veterinaria

2024/2025

# ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1. El aroma de la manzana .....	2
2.2. Precursores del aroma de la manzana .....	2
2.3. Técnicas de extracción empleadas y análisis.....	3
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
4.1. Reactivos .....	4
4.2. Muestras.....	5
4.2.1. Preparado del reconstituido.....	5
4.3. Hidrólisis del reconstituido.....	6
4.4. Análisis GC-MS.....	7
4.4.1. Condiciones del cromatógrafo y método empleado .....	8
4.5. Tratamiento de datos .....	8
4.6. Optimización de condiciones .....	8
4.6.1. Efecto de lavado .....	9
4.6.2. Volumen de ruptura y volumen de carga .....	11
4.6.3. Volumen de elución.....	13
4.6.4. Repetibilidad y reproducibilidad .....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	15
5.1. Efecto del lavado .....	15
5.2. Volumen de ruptura .....	17
5.2.1. Experimento 2.1. Volumen de ruptura por extracción Líquido-líquido .....	17
5.2.2. Experimento 2.2. Comprobación del volumen de carga mediante extracción en fase sólida secuencial.....	20
5.3. Volumen de elución.....	21
5.4. Repetibilidad y reproducibilidad .....	23
6. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	24
7. VALORACIÓN PERSONAL .....	25
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27
9. ANEXOS.....	29
9.1. Anexo I.....	29

9.2. Anexo II.....	32
9.3. Anexo III.....	35
9.5. Anexo IV.....	38
9.6. Anexo V.....	39

## RESUMEN

La pulpa de manzana es un subproducto de industrias alimentarias con un potencial aromático que no ha sido estudiado hasta el momento y, sin embargo, el aroma es un requisito fundamental para determinar la calidad de las manzanas.

Este estudio tiene como objetivo principal la optimización de un método de análisis para la cuantificación del potencial aromático de la pulpa de manzana. Para lograr esto se realizaron diferentes procesos de optimización sobre las diferentes etapas del proceso de análisis de los precursores hidrolizados de la manzana. Los parámetros estudiados fueron el efecto del lavado, volumen de ruptura, volumen de elución y repetibilidad y reproducibilidad. Para ello se partió de una mezcla de pulpa de 10 variedades de manzana para elaborar el reconstituido con ácido málico y etanol, que posteriormente se llevó a hidrolizar durante 192 horas y se analizó por Cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS).

Se encontró que la etapa de lavado era perjudicial para el estudio de 60 compuestos, que el volumen de carga de muestra óptimo fue de 10 mL y el de elución 0,8 mL. Además, se considera esta metodología optimizada como capaz de cuantificar de forma repetible y reproducible un total de 39 compuestos provenientes del hidrolizado de pulpa de manzana.

## ABSTRACT

*Apple pulp is a byproduct generated in the food industry. Apples have an aromatic potential that has not been studied yet even though the aroma is one of the main characteristics to determine its quality.*

*The main objective of this study is to optimise the methodology used for the analysis of apple's pulp aroma potential. To reach that objective, different optimisation experiments were carried out on the different steps necessary for the analysis of the hydrolysed apple precursors. The parameters tested were the effect of washing, breakthrough volume, elution volume and repeatability and reproducibility. A mixture of pulp from 10 apple varieties was used to make the reconstituted product with malic acid and ethanol, which was then hydrolysed for 192 hours and analysed with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).*

*It was found that the washing step was detrimental to the study of 60 compounds, that the optimal sample volume was 10 mL and the elution volume was 0,8 mL. This methodology is considered both repeatable and reproducible for the analysis of 39 compounds from apple pulp hydrolysed.*

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. El aroma de la manzana

La calidad de un fruto está determinada por diferentes atributos entre los que se encuentra el *flavor*. En la manzana, este atributo resulta clave, además de distintivo, para determinar su calidad (Espino-Díaz et al., 2016).

El *flavor* deriva de la combinación del gusto y de las percepciones ortonasales y retronasales (Gonçalves et al., 2018) y, en la manzana, así como en otras frutas, está conformado por los compuestos volátiles de la misma (Espino-Díaz et al., 2016).

La manzana es un fruto climatérico, lo que significa que su maduración está condicionada por la presencia de etileno, que es un regulador del crecimiento, desarrollo y senescencia del fruto (García y Herrero, 2010). En las primeras fases de la senescencia se da la maduración, etapa en la que se producen múltiples transformaciones en diferentes aspectos relativos al fruto, incluyendo cambios significativos en el aroma y sabor (García y Herrero, 2010). En la manzana, el perfil de compuestos volátiles se va modificando conforme avanza la maduración: los aldehídos son predominantes al inicio; después el contenido de alcoholes aumenta progresivamente; y al final el perfil de compuestos contiene principalmente ésteres (Fellman et al., 2000).

### 2.2. Precursores del aroma de la manzana

Los compuestos responsables del aroma pueden encontrarse de forma libre, como moléculas volátiles que producen olor, o de forma ligada, como moléculas no volátiles que no generan ningún tipo de olor. Para que los compuestos ligados puedan llegar a generar olor es necesario que dichas moléculas se liberen, ya sea por hidrólisis de un enlace, una reacción espontánea de trasposición molecular o una combinación de ambas reacciones (Ferreira y López, 2019).

La biosíntesis de los compuestos responsables del aroma de la manzana incluye rutas metabólicas donde los principales precursores son ácidos grasos, carbohidratos y aminoácidos que generan como productos más destacados aldehídos, alcoholes y ésteres (Espino-Díaz et al., 2016). Durante la maduración se intensifica la síntesis de compuestos volátiles, haciendo que el perfil aromático final varíe dependiendo de la disponibilidad de precursores y las condiciones fisiológicas de la manzana (Tang et al., 2025).

## 2.3. Técnicas de extracción empleadas y análisis

La extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) es un método de preparación de muestra que permite eliminar compuestos que pudieran generar interferencias, concentrar analitos y/o extraer analitos en un disolvente antes de aplicar una técnica cromatográfica (Thermo Fisher Scientific). La técnica SPE se basa en la distribución selectiva de los analitos entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida (Buszewski y Szultka, 2012).

La determinación de compuestos volátiles de la manzana requiere el uso de un método analítico que sea selectivo y sensible (Yang et al., 2021). Diversos estudios han abordado el análisis de precursores en frutas, como en el llevado a cabo por Alegre et al. (2020), donde se demostró la eficacia de la SPE combinada con GC-MS para aislar y caracterizar compuestos aromáticos de uvas viníferas. En base a estos antecedentes, y considerando la naturaleza comparable de los compuestos volátiles, se justifica la elección de la técnica SPE-GC-MS para el estudio del potencial aromático de manzana en el presente estudio.

La GC-MS es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas (Martín Gavilán y Gómez Juaristi). Tras la inyección, la muestra se volatiliza y entra en una columna cromatográfica capilar y es arrastrada por un gas inerte que transporta los analitos a través de la columna. Los analitos se retienen de forma reversible como consecuencia de un proceso de adsorción física, lo que produce su separación. Finalmente, los componentes separados son eluidos de la columna y registrados por un detector de MS (Martín Gavilán y Gómez Juaristi).

## 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La pulpa de manzana es un subproducto de las industrias de zumos y sidras cuyo potencial aromático no ha sido objeto de estudio hasta el momento. Este trabajo se llevó a cabo debido a que actualmente, aunque existen metodologías para el análisis de aroma potencial de otras matrices, no hay desarrollada ninguna para el análisis de manzana partiendo de sus precursores hidrolizados.

El objetivo general de este trabajo es la optimización de un método de análisis para la cuantificación del potencial aromático del tejido de pulpa de manzana.

Para llevar a cabo este objetivo general, es necesario llevar a cabo las siguientes actividades:

- Reconstituido de la mezcla de muestras de extractos de precursores de 10 variedades de manzana.
- Hidrólisis ácida de los extractos de precursores.
- Determinación del efecto de lavado sobre las muestras usando el método de extracción en fase sólida (SPE) e identificación de los compuestos obtenidos.
- Determinación del volumen de ruptura y volumen de carga de muestra.
- Optimización del volumen de elución del cartucho.
- Evaluación de la repetibilidad y reproducibilidad de los experimentos llevados a cabo.

Este trabajo también incluye objetivos formativos, los cuales son:

- Aplicación de conceptos básicos de cromatografía, técnicas de separación y de espectrometría de masas para la identificación de odorantes.
- Manejo de material cromatográfico.
- Manejo de sistemas: cámara de anoxia, centrifuga, sistemas de vacío.
- Búsqueda bibliográfica.
- Aprendizaje de diseño experimental.
- Aprendizaje de tratamiento y discusión de los datos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

Los reactivos necesarios para el desarrollo de los siguientes procedimiento son ácido málico sólido (Ácido DL málico purísimo, Cód. 142051, Panreac, España), agua purificada Milli-Q purification system (Millipore, EEUU), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) (Sodio carbonato 1-hidrato para análisis, Cód. 122032, Panreac), carbón activo (AnaeroGen™, Thermo Scientific, EEUU), diclorometano 99,8+%, estabilizado con amileno, Distol – pesticide residue grade (Fisher Scientific, UK), etanol, gradient grade for liquid chromatography (LiChrosolv, Alemania), metanol ≥99,9%, analytical reagent grade (Fisher Scientific, UK), sulfato de sodio y 2-octanol (SI) (ReagentPlus ≥99,5% (GC), 74858, Merck, Alemania).

## 4.2. Muestras

Se utilizaron muestras de pulpa procedentes un total de 10 variedades de manzana que incluyen tanto comerciales (Esperiega, Galaxy, Golden Smoothee) como autóctonas (MA-056, MA-109, MA-178, MA-184, MA-230, MA-263 y MA-296) procedentes de las zonas de Garcipollera y Teruel.

Las muestras empleadas para todos los experimentos se obtuvieron de las muestras empleadas en el Trabajo de Fin de Máster sobre “Explotación del aroma potencial de frutas autóctonas aragonesas mediante evaluación químico-sensorial” (Torres Callejero, 2023). En este trabajo, las manzanas usadas originalmente, sin piel ni pepitas, fueron licuadas y el zumo obtenido se separó de la pulpa. La pulpa se maceró en proporción 1:1 con una disolución de agua y metanol (MeOH) 50:50 (v/v) que contenía 0,02% del antioxidante BHA y 0,004% del antienzimático NaF. Después de una maceración durante 24h a temperatura ambiente, la pulpa se filtró a vacío y para eliminar el MeOH se realizó una destilación con un rotavapor (Rotavapor R-215 Buchi) equipado con una bomba de vacío (Vacuum controller V-850) a 18 bar de presión y un baño termostatizado (Heating bath B-491) a 24 °C (Buchi Labortechnik AG, Suiza). Por último, los extractos acuosos de pulpa obtenidos se mantuvieron congelados hasta su uso (Torres, 2023).

### 4.2.1. Preparado del reconstituido

Para el desarrollo de este estudio, los extractos acuosos de pulpa se descongelaron y se realizó una mezcla de todas las variedades de manzana disponibles de acuerdo a su rendimiento inicial, siguiendo las cantidades indicadas en la Tabla 1.

*Tabla 1. Cantidad de extracto acuoso de pulpa de cada variedad para el reconstituido final.*

Variedad de manzana	mL para el reconstituido
Esperiega	45
Galaxy	30
Golden Smoothee	33
MA-056	24
MA-109	35
MA-178	56
MA-184	46
MA-230	35
MA-263	38
MA-296	48
<b>Total</b>	<b>390</b>

Se preparó un total de 800 mL de reconstituido a partir de los 390 mL de muestra y se llevó a volumen con una disolución de agua MilliQ 2% de etanol y 5 g/L de ácido málico ajustada a pH 3,8 (micro pH 2002, Crison, Hach Lange Spain S.LU).

#### 4.3. Hidrólisis del reconstituido

El reconstituido de las pulpas de manzana se distribuyó en 40 viales roscados de 20 mL (Análisis Vínicos S.L., España) etiquetados según el experimento para el que se iban a destinar (como se detallará posteriormente). Estos viales se metieron en la cámara de anoxia (Jacomex, Francia) (Figura 1) y se dejaron 30 min destapados para que el oxígeno se reemplazase por argón (gas de la cámara). Una vez transcurrido este tiempo, se cerraron los viales y se procedió al embolsado.



Figura 1. Cámara de anoxia.

Los viales se distribuyeron en bolsas termosellables (Coimbra Pack S.L., España) etiquetadas según la siguiente distribución: para el experimento 1 se agruparon 4 viales; para el experimento 2, 3 viales; para el 3, 10 viales divididos en dos bolsas; para el 4, 10 viales también divididos en dos bolsas; y para el experimento 5, 13 viales distribuidos en 3 bolsas.

El embolsado de las muestras fue doble. Primero se metieron los viales en una bolsa de plástico y se termosellaron a vacío. En una segunda bolsa se añadió carbón activo (AnaeroGen™, Thermo Scientific, EEUU), se introdujo la bolsa cerrada anteriormente y se volvió a termosellar a vacío (Figura 2).



Figura 2. Doble embolsado con carbón activo de los viales.

Al añadir el carbón activo lo que se consigue es que en caso de que entre algo de aire a la bolsa, el carbón atrape el oxígeno para que éste último no pueda reaccionar con las muestras.

Las muestras embolsadas que no se iban a utilizar inmediatamente se refrigeraron a 5 °C, mientras que las muestras que se hidrolizaron se llevaron a estufa Memmert 10-800 (Memmert GmbH & Co., Alemania) a 75 °C durante 192 horas.

#### 4.4. Análisis GC-MS

En el transcurso de este estudio, se empleó un cromatógrafo de gases 5977C/MSD – 8890 GC System (Agilent Technologies, EE.UU.) (Figura 3) en diversas ocasiones para poder obtener los datos correspondientes a cada experimento realizado.



Figura 3. Cromatógrafo de gases-masas (8890 GC de Agilent).

#### 4.4.1. Condiciones del cromatógrafo y método empleado

El inyector se mantuvo a 250 °C y la inyección fue de 2 µL en modo splitless. El programa de temperaturas del horno fue la siguiente: 40 °C por 5 minutos; de 40 a 65 °C fue aumentando 1 °C/min; de 65 a 120 °C fue aumentando 4 °C/min; luego aumentó a una velocidad de 2 °C/min hasta alcanzar los 145 °C; hubo otro aumento de temperatura hasta 240 °C a velocidad 4 °C/min; por último, se mantuvo a 240 °C por 35 minutos. El gas portador fue Helio a un flujo de 11 Psi. El detector fue un espectrómetro de masas (5977C GC/MSD, Agilent Technologies) que se mantuvo a 230 °C y se hizo un barrido de masas de 40 a 250 m/z en SCAN.

### 4.5. Tratamiento de datos

Para el análisis de los compuestos se identificaron los picos obtenidos con ayuda del programa MassHunter Qualitative Analysis 12.0 (Agilent Technologies) y NIST MS Search 2.4. De la lista se seleccionaron sólo aquellos compuestos que presentan aroma de acuerdo a bases de datos como Pherobase. Tras esto, en el programa MassHunter Quantitative Analysis (Agilent Technologies) se creó un método de integración en base a la lista de compuestos aromáticos identificados previamente con sus tiempos de retención y sus masas de cuantificación para poder integrar los picos de los compuestos de cada experimento.

De los datos obtenidos de la integración se emplearon las áreas absolutas de cada compuesto para calcular las áreas relativas (Ecuación 1).

$$\text{Área relativa} = \frac{\text{área abs compuesto}}{\text{área abs SI (2 - octanol)}} \cdot 100$$

*Ecuación 1. Cálculo del área relativa para un compuesto.*

Los datos fueron analizados de una forma específica en cada experimento, por lo que se detallará en el apartado correspondiente.

### 4.6. Optimización de condiciones

Durante el transcurso del estudio se realizaron diferentes experimentos con el objetivo de optimizar las condiciones de la metodología cuantitativa para el análisis del aroma potencial de manzana.

Debido a que las muestras presentaban una gran cantidad de partículas en suspensión (Figura 4a), fue necesario incluir una etapa de centrifugado previa a la realización de cada experimento para que no generasen interferencias ni se obturasen los cartuchos de 1 mL para SPE (Empy SPE tube 57240-U, Merck). Los viales correspondientes a cada experimento se mezclaron en uno o

más tubos Falcon, se centrifugaron a una velocidad de 4500 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrifuga (Beckman Coulter (Alemania), Allegra X-22R) y, una vez concluida la centrifugación (Figura 4b), se recogió el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico. De esta manera se obtuvo la mezcla de pulpa de manzana reconstituida centrifugada e hidrolizada (a partir de ahora llamada “mezcla de pulpa hidrolizada”).



Figura 4. Muestras con partículas en suspensión (a, izquierda) y tras el centrifugado (b, derecha).

La metodología empleada a lo largo de los diferentes experimentos está basada en el método de análisis de compuestos volátiles minoritarios (trazas) diseñado por López et al. (2002). Según esta metodología, primero se realiza un acondicionamiento del cartucho, después se hace pasar la muestra, posteriormente se realiza una etapa de lavado, el secado del cartucho y por último se realiza la elución del extracto. En este trabajo se realiza la optimización de las etapas de lavado, la cantidad de muestra cargada y el volumen de elución.

Previamente a la realización de los experimentos que serán detallados a continuación, fue necesario preparar los cartuchos de SPE que se emplearon. Estos cartuchos se prepararon con ayuda una balanza analítica (HR-200, A&D Weighing Co., EE.UU.) y se pesaron  $70 \pm 0,5$  g de la resina ISOLUTE ENV+ (Biotage, Suecia).

#### 4.6.1. Efecto de lavado

El objetivo de esta primera etapa de optimización fue comprobar el efecto del lavado con agua/MeOH 3% (v/v) y 1% NaHCO<sub>3</sub>. Se trabajó con cuatro muestras de 15 mL cada una, dos de las cuales incluyeron una etapa de lavado y en las otras dos restantes la disolución de lavado se sustituyó por agua destilada.

Preparación del extracto: Se acondicionó secuencialmente un cartucho de resina de 70 mg con 2 mL de diclorometano (DCM), 2 mL de MeOH y 2 mL de disolución hidroalcohólica ajustada al 2% y pH 3,8 en un sistema de vacío VacElut 20 Cartridge Manifolds (Agilent Technologies).

Posteriormente, en cada cartucho se añadieron 15 mL de la “mezcla de pulpa hidrolizada” junto con 100  $\mu$ L de la disolución de estándares internos (SI) (5,7 mg/L de 2-octanol al 40% de etanol en agua), y se percolaron sobre el cartucho anterior con ayuda de una bomba de vacío (Figura 5).



Figura 5. Acondicionamiento de los cartuchos.

Tras esto, se realizó el lavado con 1,5 mL de la disolución de lavado en las dos muestras que lo incluían; a las muestras sin lavado se les hizo pasar 1,5 mL de agua destilada. Concluida esta última etapa, se secaron los cartuchos empleando vacío para poder eliminar la posible agua residual que pudiera quedar.

Una vez secos, estos cartuchos se eluyeron con una bureta de clase A de 25 mL, gota a gota, con 800  $\mu$ L de DCM/5% de MeOH. El eluato se recogió en viales etiquetados de 2 mL (Análisis Vínicos S.L.). Posteriormente, 200  $\mu$ L del mismo se trasvasaron a un vial de inserto (Micro vial Topsert roscado 200  $\mu$ L AV1189, Análisis vínicos S.L.) para ser inyectado en el cromatógrafo GC-MS.

Tratamiento de datos: Para el análisis de resultados de este experimento se trabajó con las áreas absolutas de cada compuesto. Después, se calculó la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa (DSR%) de cada muestra. Estos cálculos se realizaron en Microsoft Excel a partir de las fórmulas “=promedio”, “=desvest” y “=desvest/promedio\*100”, respectivamente.

Una vez obtenidos estos datos, entre las muestras con y sin lavado, se realizó un test t y se calculó la T experimental siguiendo la Ecuación 2. También fue necesario calcular la T crítica de una cola, lo cual se calculó usando la fórmula de Excel “=INV.T”, donde la probabilidad empleada fue 0,05 y los grados de libertad, 2.

$$T_{exp} = \frac{\bar{x}_{\text{sin lavado}} - \bar{x}_{\text{con lavado}}}{\sqrt{\frac{s_{\text{sin lavado}}^2}{n_{\text{sin lavado}}} + \frac{s_{\text{con lavado}}^2}{n_{\text{con lavado}}}}}$$

Ecuación 2. Cálculo de T experimental

Obtenidos estos datos, se calculó la distribución de t de Student de cola derecha a partir de la T experimental usando la fórmula de Excel “=DISTR.T.CD” y donde los grados de libertad fueron 2. De estos últimos datos, se hizo una clasificación en función de su significatividad ( $P<0,05$ ).

#### 4.6.2. Volumen de ruptura y volumen de carga

##### 4.6.2.1. Experimento 2.1. Volumen de ruptura por extracción líquido-líquido

Preparación del extracto: Para el primer sub-experimento se partió de 60 mL de muestra. Sólo fue necesario un cartucho de resina, el cual se acondicionó haciendo pasar de forma secuencial 2 mL de DCM, 2 mL de MeOH y 2 mL de una disolución hidroalcohólica 2% EtOH ajustada a pH 3,8. Después, se prepararon 50 mL de muestra, que consistía en un matraz de 50 mL de “mezcla de pulpa hidrolizada” y 333  $\mu$ L disolución de SI (5,7 mg/L de 2-octanol al 40% de etanol en agua), y se percolaron a través del cartucho. El eluato se fue recogiendo en fracciones de 5 mL secuenciales sin interrumpir su paso por el cartucho como se muestra en la Figura 6. De esta forma se obtuvieron un total de 10 fracciones (Figura 7). La muestra destinada al control, se preparó con 5 mL de la “mezcla de pulpa hidrolizada” y 33  $\mu$ L de la misma disolución de SI, que se reservó directamente sin hacerla pasar por el cartucho.

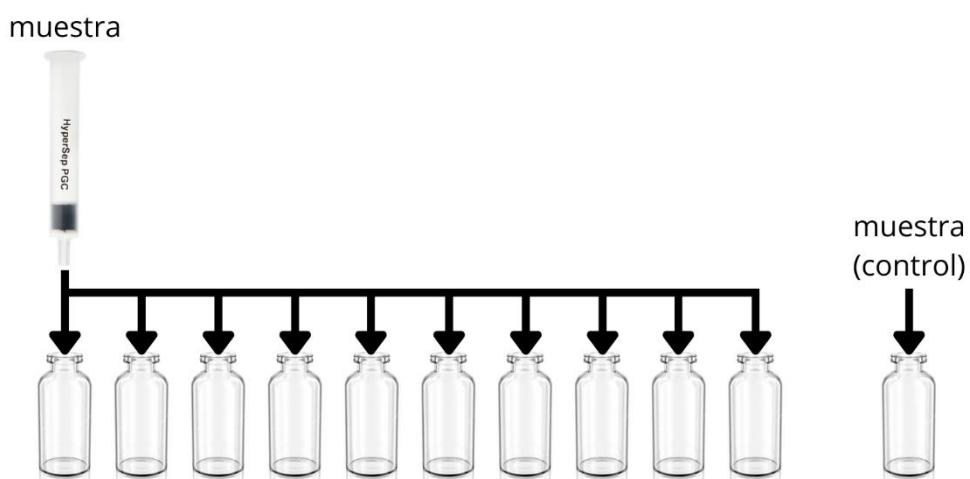


Figura 6. Esquema de recolección de 50 mL de muestra en fracciones de 5 mL y control.

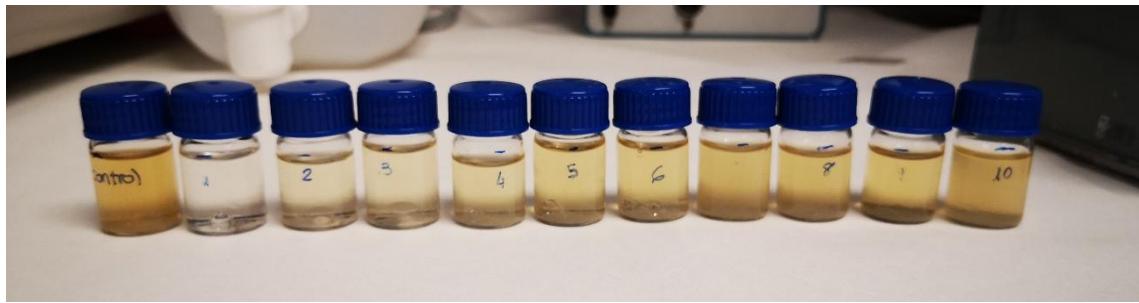


Figura 7. Viales con la disolución control y las fracciones de 5 mL.

Una vez obtenidas todas las fracciones, se realizó una microextracción líquido-líquido a cada una de ellas. Para ello, se añadió 1 mL de DCM a cada una de ellas, se agitó de forma manual durante un minuto y se dejó reposar por 10 minutos. Pasado el tiempo de reposo, se pudo observar la separación de las fases, donde el DCM quedó depositado en el fondo del vial.

Con ayuda de una micropipeta se extrajo el DCM y se llevó a un vial de 2 mL etiquetado. Posteriormente, se añadió una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro para absorber los posibles restos de agua que pudieran haber quedado. El DCM resultante se trasvasó a un vial de inserto de 200  $\mu$ L y se inyectaron 2  $\mu$ L del mismo en el cromatógrafo GC-MS.

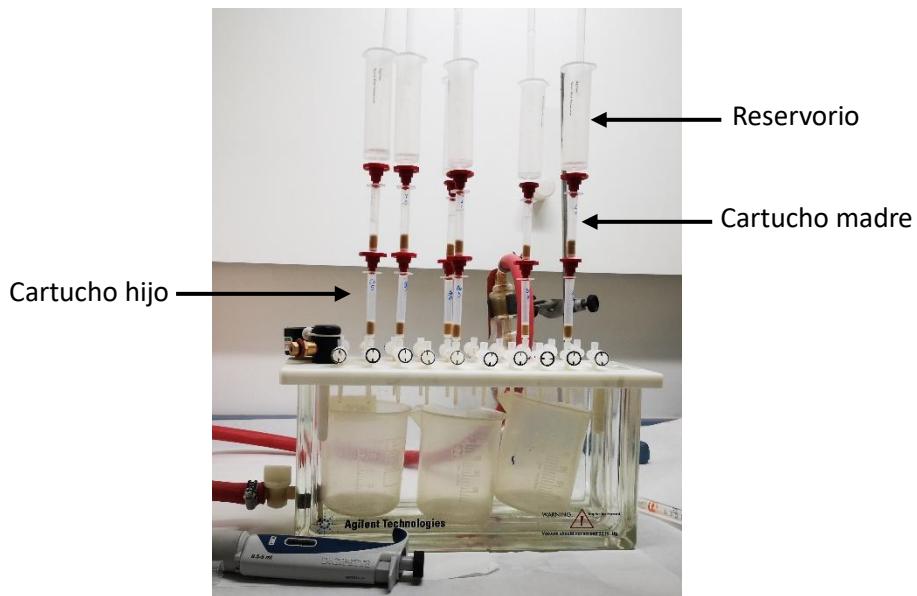
Tratamiento de datos: Se integraron las señales obtenidas de todas las fracciones realizadas en el experimento para obtener las áreas absolutas y, a partir de estas, se calculó el % de área de cada compuesto en relación con el área de la muestra control.

El criterio de selección del volumen de ruptura que se siguió fue que la pérdida de los compuestos debía ser menor o igual al 10%.

#### 4.6.2.2. Experimento 2.2. Volumen de carga mediante extracción en fase sólida secuencial

Preparación del extracto: Para el segundo sub-experimento, ahora orientado al volumen de carga, se utilizaron 20 mL de mezcla de pulpa hidrolizada y un total de 12 cartuchos. En la mitad de los cartuchos se trabajó con 5 mL de muestra y en la otra mitad, con 10 mL, de manera que se hicieron 3 réplicas para 5 mL y tres para 10 mL.

Los cartuchos se colocaron por parejas de forma consecutiva, de manera que un cartucho (denominado “cartucho madre”) quedaba encima de otro inferior (denominado “cartucho hijo”) como se muestra en la Figura 8. De esta manera, el cartucho madre recibía la muestra directamente y el cartucho hijo la muestra ya filtrada por el colocado encima suyo.



*Figura 8. Colocación de los cartucho madre e hijo.*

El acondicionamiento de los cartuchos se llevó a cabo haciendo pasar de forma secuencial 2 mL de DCM, 2 mL de MeOH, 2 mL de una disolución hidroalcohólica 2% EtOH ajustada a pH 3,8. Después, se añadió la cantidad correspondiente de muestra, “mezcla de pulpa hidrolizada” junto al SI (5,7 mg/L de 2-octanol al 40% de etanol en agua), en cada uno de los cartuchos madre y, una vez terminó de pasar por los cartuchos hijo, se procedió con la etapa de lavado añadiendo 1,5 mL de agua destilada. Una vez finalizado el lavado, los cartuchos se secaron con el sistema de vacío por 30 minutos y eluyeron con 800 µL de DCM/5% MeOH y los eluatos se recogieron en viales de 2 mL, de los cuales 200 µL se trasvasaron a un vial de inserto para poder ser inyectados en el cromatógrafo GC-MS.

Tratamiento de datos: En este experimento se trabajó con las áreas relativas de cada compuesto con respecto al área del SI añadido, como se presenta en la ecuación 1.

Se calcularon la media, desviación estándar y DSR% de cada muestra según si eran cartuchos madre o hijo y el volumen de mezcla de pulpa hidrolizada cargado. Una vez obtenidos todos estos datos, a partir de las medias se calculó el % de pérdida de compuestos en los cartuchos hijos respecto a los cartuchos madre; esto permitió la posterior elección del volumen de carga de muestra en función del número de compuestos y la cantidad en que se perdían.

#### 4.6.3. Volumen de elución

Preparación del extracto: En esta tercera parte del trabajo se buscaba optimizar el volumen de elución. Se utilizaron 80 mL de mezcla de pulpa hidrolizada y 8 cartuchos para poder hacer cuatro ensayos, cada uno de ellos por duplicado. El volumen de carga de muestra en los cartuchos empleado derivó de los resultados del experimento anterior.

Se empezó con el acondicionamiento de los cartuchos con 2 mL de DCM, 2 mL de MeOH, 2 mL de una disolución hidroalcohólica 2% EtOH ajustada a pH 3,8. Seguidamente se añadió a cada cartucho 10 mL de la “mezcla de pulpa hidrolizada” y por último 1,5 mL de agua destilada para el lavado.

Los cartuchos se dejaron secando con el sistema de vacío por 30 minutos y, a continuación, se siguió con la etapa de elución donde se modificó el volumen de DCM/5% MeOH siendo 0,6/ 0,8/ 1 y 1,2 mL. Terminada la elución se añadieron 40 µL de una disolución de 2-octanol en DCM a una concentración de 15 mg/L.

Tratamiento de datos: A partir de las áreas absolutas se calcularon las relativas para cada uno de los compuestos identificados. De cada volumen de elución que se probó, y con sus respectivas replicas, se calcularon la media, desviación estándar y DSR%.

De forma adicional, con las áreas relativas de los compuestos se llevó a cabo un análisis estadístico de ANOVA de 1 factor, donde la variable cuantitativa fue el área de los compuestos y la variable cualitativa, las muestras a analizar. Los valores F y P obtenidos de cada compuesto sirvieron para determinar las diferencias significativas de entre los volúmenes de elución probados y así poder elegir el que más adecuado.

#### 4.6.4. Repetibilidad y reproducibilidad

El estudio de la repetibilidad y la reproducibilidad se realizó con el procedimiento optimizado de las etapas anteriores.

Preparación del extracto para repetibilidad: Para llevar a cabo el estudio de la repetibilidad, en un mismo día se hicieron 3 réplicas. Para esto se prepararon 10 mL de “mezcla de pulpa hidrolizada” en un matraz de 10 mL al que se le adicionaron 67 µL de disolución de SI (5,7 mg/L de 2-octanol al 40% de etanol en agua) y 3 cartuchos.

Sobre el cartucho acondicionado con 2 mL de DCM, 2 mL de MeOH y 2 mL de una disolución hidroalcohólica 2% EtOH con pH 3,8 de forma secuencial, se le añadieron los 10 mL de la muestra y por último se lavaron con 1,5 mL de agua destilada.

Una vez concluido el acondicionamiento de los cartuchos, se secaron con ayuda del sistema de vacío durante 30 min y se realizó la etapa de elución, con 800 µL de DCM/5% MeOH, recogiendo los eluatos en viales de 2 mL para después llevarlos a viales de inserto de 200 µL para ser inyectados en el cromatógrafo GC-MS.

Preparación del extracto para reproducibilidad: La reproducibilidad se realizó siguiendo el mismo procedimiento, pero con una sola replica por día y en 3 días distintos.

Tratamiento de datos: De los datos de las áreas absolutas de los compuestos se calcularon las áreas relativas de cada uno respecto al SI (2-octanol) siguiendo la ecuación 1.

Para el análisis de la repetibilidad se calculó la media, desviación estándar y DSR% de las réplicas hechas el mismo día. Para el estudio de la reproducibilidad se calculó la media, desviación estándar y DSR% del promedio de las réplicas del día 1 con los datos de las muestras analizadas los días 2 y 3.

Estos cálculos se realizaron para poder comparar entre todos los compuestos las DSR% de la repetibilidad y reproducibilidad.

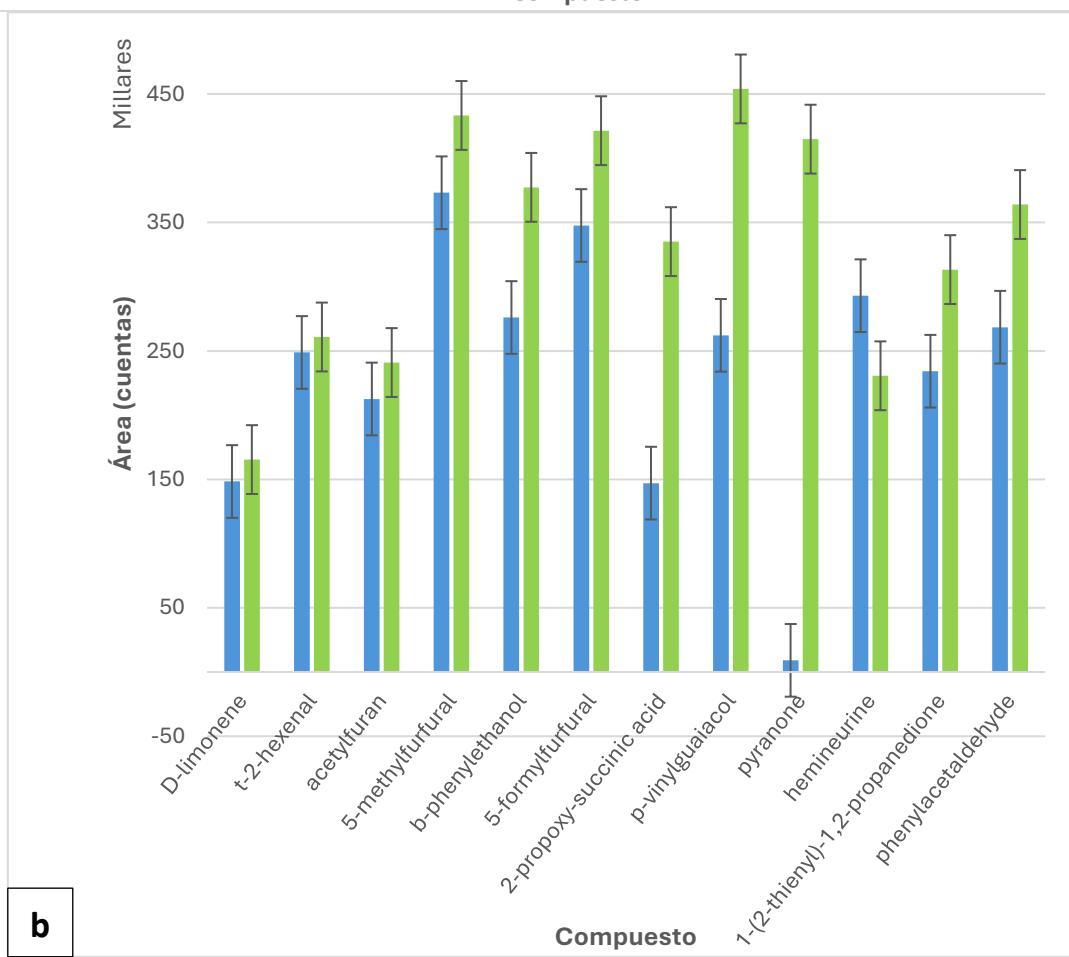
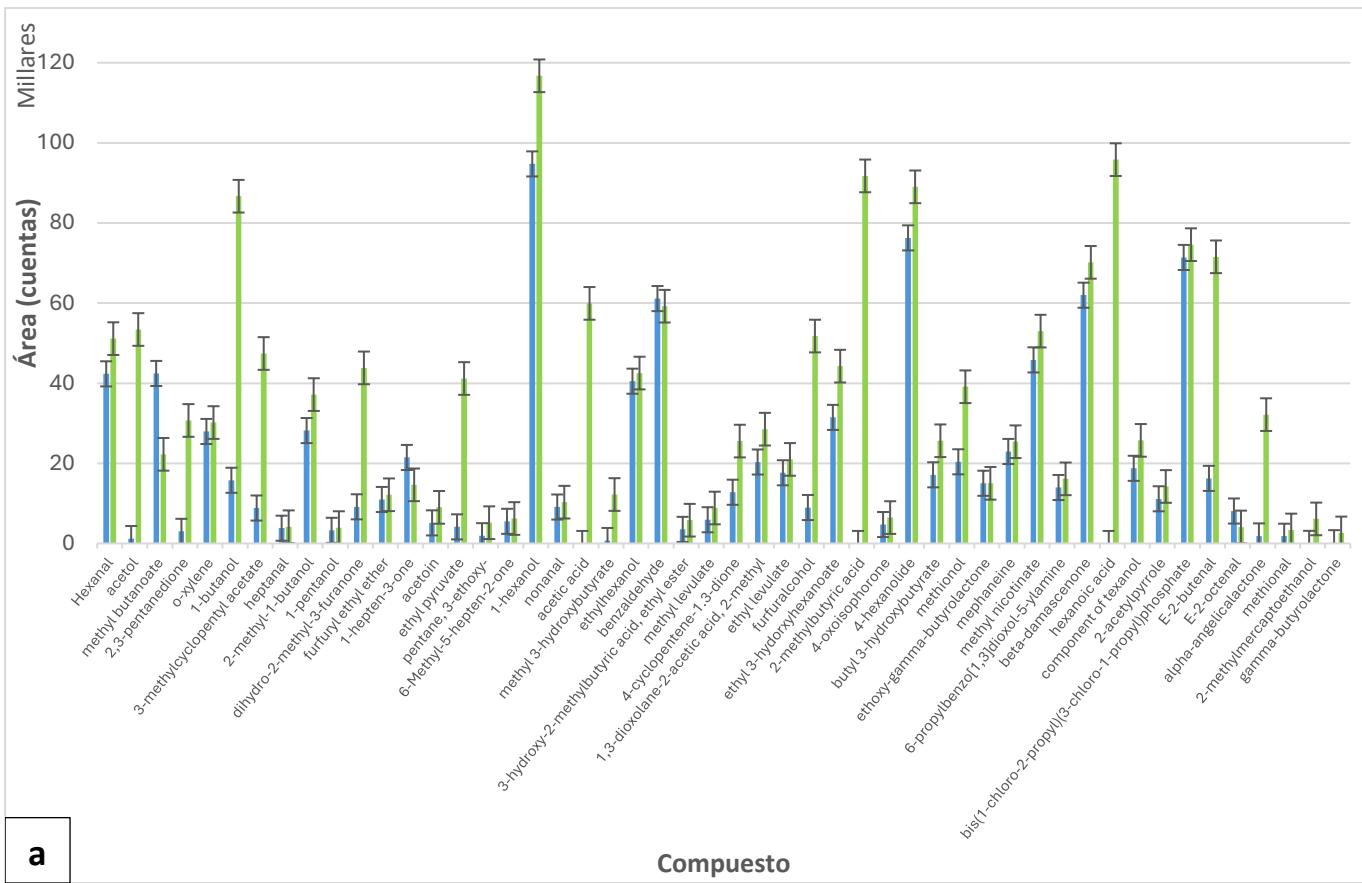
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Efecto del lavado

En este experimento se pretendía estudiar si la etapa de lavado podría estar haciendo que se perdiera algún compuesto de los analizados. En este primer experimento se consiguieron identificar un total de 68 compuestos de los cuales 46 resultaron estar afectados por el lavado, es decir, que presentaban un valor de T experimental mayor que la T crítica en el test t; esto implica que el valor P era inferior a 0,05 y por lo tanto se podía considerar la diferencia como significativa. La lista completa de los compuestos identificados se puede ver en el Anexo I.

A pesar de que el número total de compuestos identificados en las muestras con lavado y sin lavado fue similar, se pudo observar que al aplicar la etapa de lavado con agua/MeOH 3% (v/v) y 1% NaHCO<sub>3</sub> se perdían algunos compuestos (Anexo II), principalmente ácidos como el ácido acético, el ácido 2-metilbutírico y el ácido hexanoico. De hecho, las áreas obtenidas en las muestras sin lavado eran mayores en 60 de los 68 compuestos analizados frente a las muestras con lavado como se puede observar en Anexo II o en la Figura 9 a modo de gráficas comparativas para algunos ejemplos. En la Figura 9, además, se puede observar que las áreas obtenidas variaron mucho entre compuestos: más del 70% de los compuestos poseían un área inferior a 120 mil cuentas (Figura 9 a); 12 compuestos mostraron un área de hasta 450 mil cuentas (Figura 9 b); y 6 compuestos llegaron a áreas superiores a 1 millón de cuentas (Figura 9 c).

Esto parece indicar que el lavado con agua/MeOH 3% (v/v) y 1% NaHCO<sub>3</sub> no es recomendable para esta matriz, y se empleará un lavado con 1,5 mL de agua.



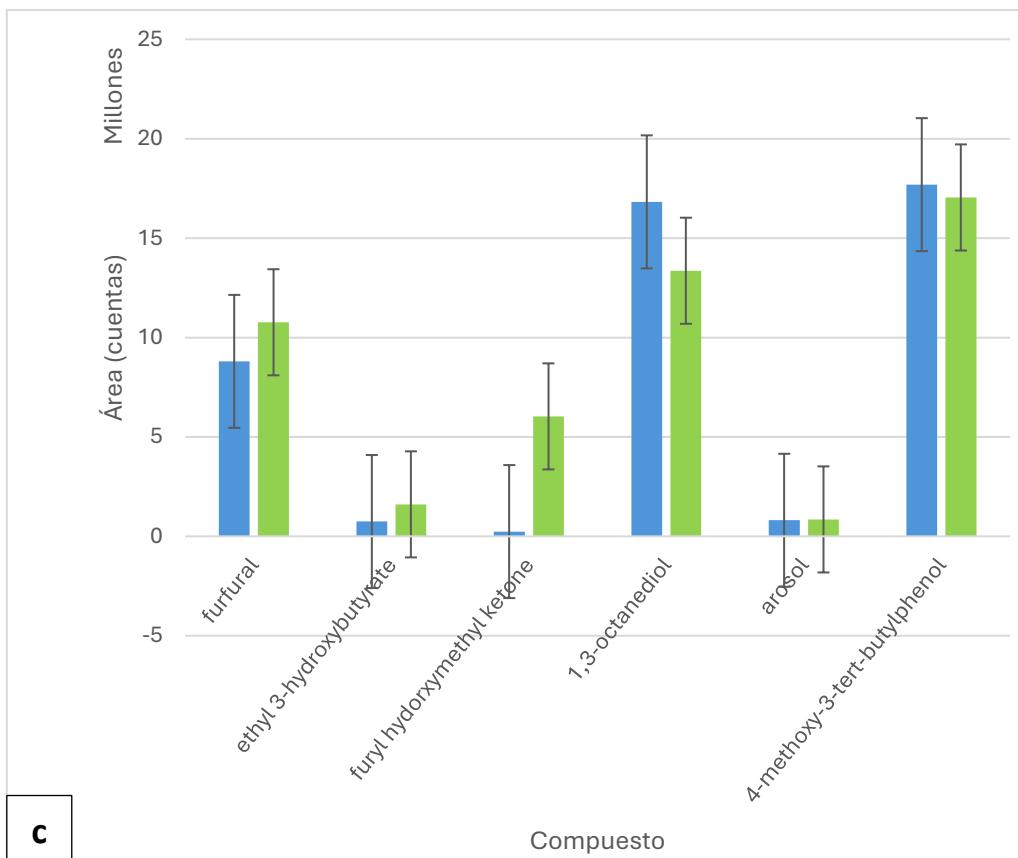


Figura 9. Representación gráfica de las áreas medias de los compuestos con sus respectivas barras de error. Las muestras con lavado aparecen representadas de color azul, y las muestras sin lavado, de color verde. a) compuestos con áreas hasta 120 mil cuentas; b) compuestos con áreas hasta 460 mil cuentas; c) compuestos con áreas hasta 17 millones cuentas.

## 5.2. Volumen de ruptura

El volumen de ruptura define cuánto volumen de muestra puede atravesar el cartucho de SPE antes de que el analito pase sin retenerse (Larrivee y Poole, 1994). Por su parte, el volumen de carga corresponde al volumen de muestra añadido al cartucho de extracción, el cual debe mantenerse por debajo o, como máximo, igual al volumen de ruptura para garantizar una retención eficiente del analito (Wells, 2000).

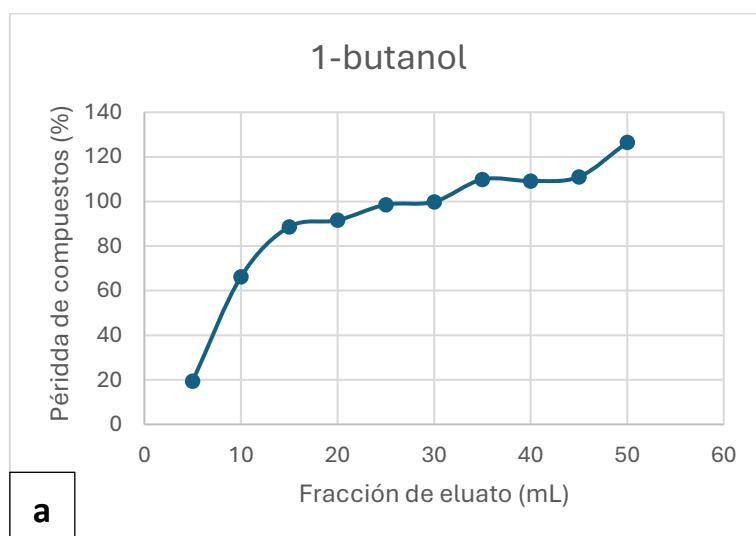
### 5.2.1. Experimento 2.1. Volumen de ruptura por extracción Líquido-líquido

En este experimento se pretendía estudiar cual es el volumen de ruptura del cartucho de SPE utilizado para cada compuesto identificado en la manzana.

Se hizo una selección de los compuestos en base a si poseían olor (con la base de datos Pherobase) y su polaridad, utilizando la base de datos ChemSpider (Royal Society of Chemistry) donde se buscó el valor logP correspondiente a cada uno de ellos. Se vio que los compuestos con un logP menor (polares) tenían un porcentaje de pérdida mayor a los compuestos cuyo logP era mayor (apolares).

Finalmente, la lista de compuestos quedó reducida a 42 tras eliminar los compuestos que no olían ni se retenían de forma adecuada, siendo esta la lista completa con la que se trabajó en los siguientes experimentos.

Con los datos obtenidos, se calculó el % de área que había en relación al área de la muestra control, y se representó este porcentaje frente al volumen que se había cargado hasta ese momento (Figura 10). Como se puede observar, existen compuestos que se pierden desde la primera fracción de 5 mL en una proporción superior al 10% (Figura 10 a), de hecho, diez de los compuestos identificados mostraron una pérdida superior al 10% en la primera fracción de 5 mL recogida, de los cuales uno de ellos no mostraba olor. Hubo compuestos en los que en las primeras fracciones no se perdían, pero a partir de cierto punto se produce un incremento en la pérdida como se puede observar en la Figura 10 b. Por otro lado, 13 compuestos tuvieron un porcentaje de pérdida de 0 en todas las fracciones recogidas (Figura 10 c), de los cuales 10 producían olor. Los compuestos restantes (Figura 10 d) mostraron una pérdida progresiva desde el comienzo en relación con la fracción eluida, lo que indica que no se lograban retener completamente al pasar por el cartucho acondicionado. La recopilación completa de datos por compuesto aparece en el Anexo III.



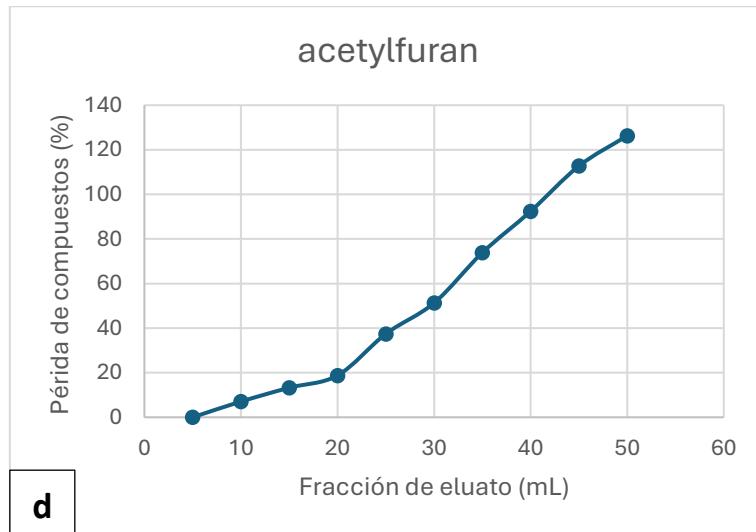
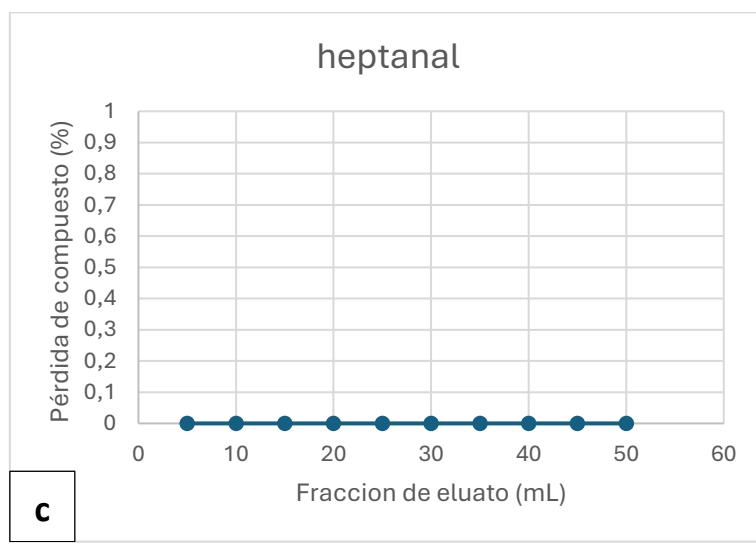
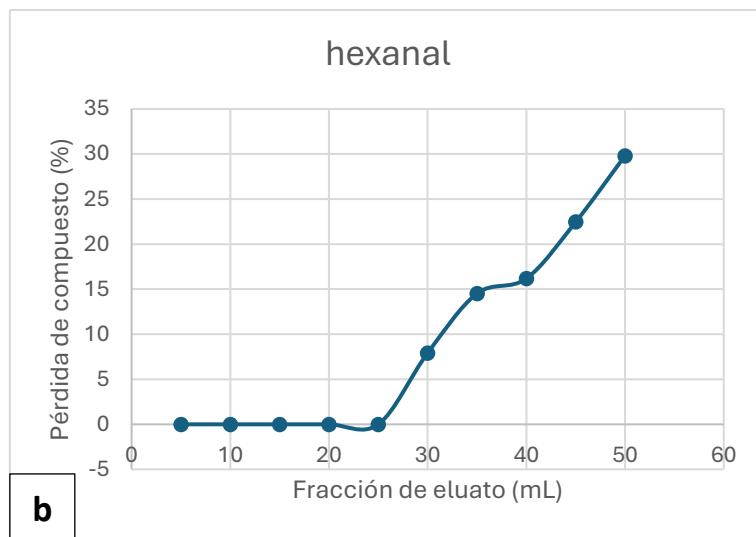


Figura 10. Ejemplos de la representación gráfica del % de pérdida de un compuesto en relación con la fracción de eluato. a) 1-butanol, b) hexanal, c) heptanal, d) acetilfurano.

De acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, se concluye que el volumen de ruptura es de 5 mL. No obstante, el extracto líquido-líquido de la muestra control presentaba un color

amarillo intenso, en contraste con los extractos correspondientes a las fracciones, los cuales se mostraban con una coloración menos intensa o incoloros (Figura 7). Esta observación sugiere que, además de los compuestos de interés, en la muestra control se extrajeron numerosos compuestos adicionales. Esta hipótesis se corroboró al realizar el análisis de los cromatogramas de la muestra control, en los cuales se pudieron apreciar deformaciones en los picos de múltiples compuestos, probablemente debido a interferencias. Estos resultados indican que el control podía estar comprometido y, por lo tanto, que el volumen de ruptura podría ser superior a 5 mL.

### 5.2.2. Experimento 2.2. Comprobación del volumen de carga mediante extracción en fase sólida secuencial

Este experimento se hizo para verificar qué volumen de carga de muestra era el idóneo para el desarrollo de la metodología. Esta comprobación se realizó ya que al determinar el volumen de ruptura por extracción líquido-líquido se planteó la posibilidad de que el volumen de ruptura podría ser superior a 5 mL. Para comprobar el volumen de carga real se hizo una SPE utilizando un sistema de doble cartucho; de esta manera todo compuesto que no se logró retener en el cartucho madre pasó al cartucho hijo

Como se refleja en la Tabla 2, en los cartuchos cargados con 10 mL de “mezcla de pulpa hidrolizada”, 17 compuestos presentaban un porcentaje de pérdida superior a 10% (marcados en amarillo); mientras que en los cartuchos cargados con 5 mL, 16 compuestos tenían un porcentaje de pérdida superior a 10 %. A pesar de que al utilizar 10 mL de muestra como volumen de carga se pierde un compuesto más, se consideró que presentaba mejores resultados frente a un volumen de carga de 5 mL debido a que los picos del cromatograma eran mejores (señal más intensa y mejor forma de pico) para 10 mL. Es por esto que en los sucesivos experimentos se trabajó con un volumen de carga de 10 mL.

*Tabla 2. Listado de compuestos, su media de área relativa media correspondiente al volumen de carga y posición del cartucho, y % de pérdida. En amarillo se muestran aquellos compuestos cuyo % de pérdida es >10, y en rojo, <10.*

Compuesto	10 mL			5 mL		
	Cartucho madre	Cartucho hijo	% pérdida	Cartucho madre	Cartucho hijo	% pérdida
Hexanal	0,188	0,033	17	0,087	0,026	30
2,3-pentanedione	0,222	0,113	51	0,166	0,028	17
heptanal	0,021	0,005	23	0,012	0,006	48
2-methyl-1-butanol	0,193	0,045	24	0,104	0,031	30
t-2-hexenal	0,616	0,006	1	0,310	0,000	0
dihydro-2-methyl-3-furanone	0,276	0,221	80	0,251	0,057	23
furfuryl ethyl ether	0,046	0,000	0	0,026	0,000	0
1-hepten-3-one	0,036	0,003	9	0,012	0,002	17

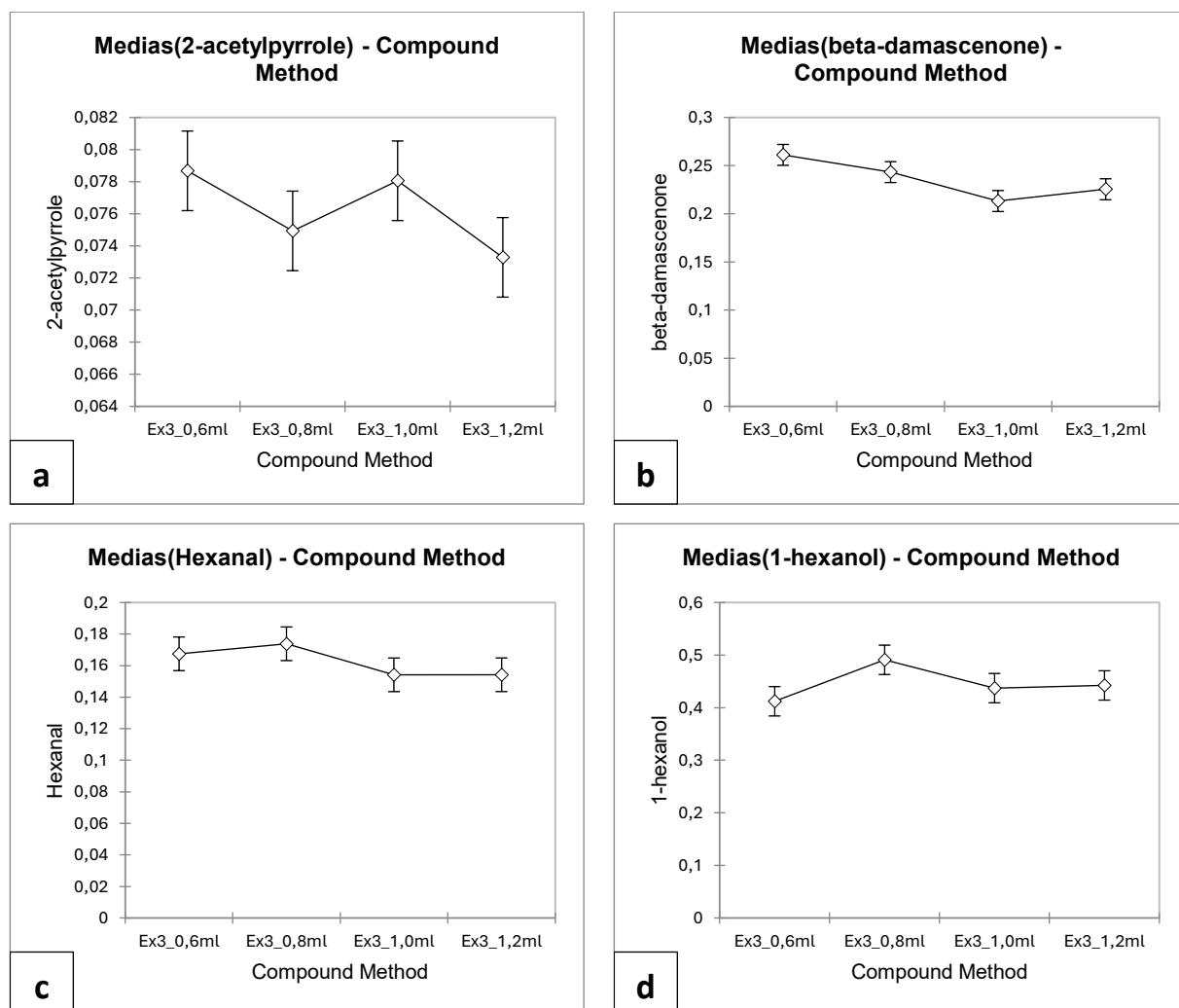
Compuesto	10 mL			5 mL		
	Cartucho madre	Cartucho hijo	% pérdida	Cartucho madre	Cartucho hijo	% pérdida
1-hexanol	0,442	0,029	6	0,206	0,019	9
nonanal	0,060	0,027	44	0,042	0,025	60
furfural	50,355	14,470	29	35,194	1,509	4
methyl 3-hydroxybutyrate	0,045	0,047	105	0,064	0,028	43
acetyl furan	1,170	0,035	3	0,577	0,005	1
ethyl 3-hydroxybutyrate	5,432	1,819	33	3,762	0,178	5
benzaldehyde	0,211	0,055	26	0,137	0,053	39
3-hydroxy-2-methylbutyric acid, ethyl ester	0,019	0,000	2	0,011	0,000	0
methyl levulate	0,054	0,006	12	0,030	0,000	0
5-methylfurfural	2,357	0,196	8	1,222	0,095	8
ethyl levulate	0,102	0,001	1	0,053	0,000	0
phenylacetaldehyde	1,377	0,364	26	0,858	0,423	49
ethyl 3-hydroxyhexanoate	0,158	0,000	0	0,076	0,000	0
2-methylbutyric acid	0,532	0,044	8	0,270	0,004	1
4-oxoisophorone	0,018	0,000	2	0,008	0,000	0
4-hexanolide	0,285	0,017	6	0,142	0,006	5
butyl 3-hydroxybutyrate	0,054	0,000	0	0,015	0,000	0
methionol	0,037	0,004	10	0,011	0,010	93
mephaneine	0,067	0,000	0	0,034	0,000	0
methyl nicotinate	0,136	0,000	0	0,064	0,000	0
beta-damascenone	0,211	0,000	0	0,097	0,000	0
hexanoic acid	0,453	0,030	7	0,212	0,022	11
component of texanol	0,088	0,014	16	0,046	0,014	30
b-phenylethanol	2,039	0,244	12	0,688	0,178	26
2-acetylpyrrole	0,065	0,000	0	0,031	0,000	0
1,3-octanediol	40,686	0,000	0	21,992	0,000	0
arosol	2,592	0,064	2	1,292	0,080	6
p-vinylguaiacol	1,448	0,073	5	0,618	0,025	4
hemineurine	0,781	0,039	5	0,177	0,014	8
E-2-butenal	0,115	0,075	65	0,099	0,019	20
E-2-octenal	0,000	0,000	-	0,000	0,000	-
2-octanol (SI)	1,000	1,000	100	1,000	1,000	100
alpha-angelicalactone	0,146	0,021	15	0,085	0,006	7
methional	0,003	0,000	0	0,000	0,000	-
1-(2-thienyl)-1,2-propanedione	1,725	0,008	0	0,849	0,000	0

### 5.3. Volumen de elución

Este experimento se hizo con el objetivo de analizar la influencia del volumen de eluyente (DCM/5% de MeOH) empleado en la etapa elución sobre los compuestos encontrados en la “mezcla de pulpa hidrolizada”. Se probaron diferentes volúmenes de elución (0,6/ 0,8/ 1 y 1,2 mL) y después se analizaron los datos obtenidos.

El ANOVA de 1 factor realizado sobre las áreas relativas de los compuestos mostraron que tan solo 7 compuestos, de un total de 42, eran significativos, es decir, presentaban un valor P superior a 0,05 (Anexo IV). Estos compuestos eran: hexanal, 1-hexanol, furfural, 4-hexanolida,  $\beta$ -damascenona, 2-acetylpirrol y p-vinilguaiacol. Como en el resto de compuestos los volúmenes de elución empleados no resultaron ser significativos, el volumen de elución óptimo se seleccionó basándose en los compuestos que sí eran significativos (Figura 11).

El 2-acetylpirrol (Figura 11 a) y  $\beta$ -damascenona (Figura 11 b) mostraron una mayor concentración cuando se eluía con 0,6 mL; el hexanal (Figura 11 c), 1-hexanol (Figura 11 d) y p-vinilguaiacol (Figura 11 e) cuando se eluía con 0,8 mL; y el furfural (Figura 11 f) y 4-hexanolida (Figura 11 g) al eluir con 1,2 mL. Dado que para un volumen de elución de 0,8 mL había más compuestos que lo consideraban óptimo, y que para los otros 4 compuestos la solución de compromiso era 0,8 mL, se consideró 0,8 mL de DCM/5% de MeOH como el volumen de elución indicado para el desarrollo de esta metodología.



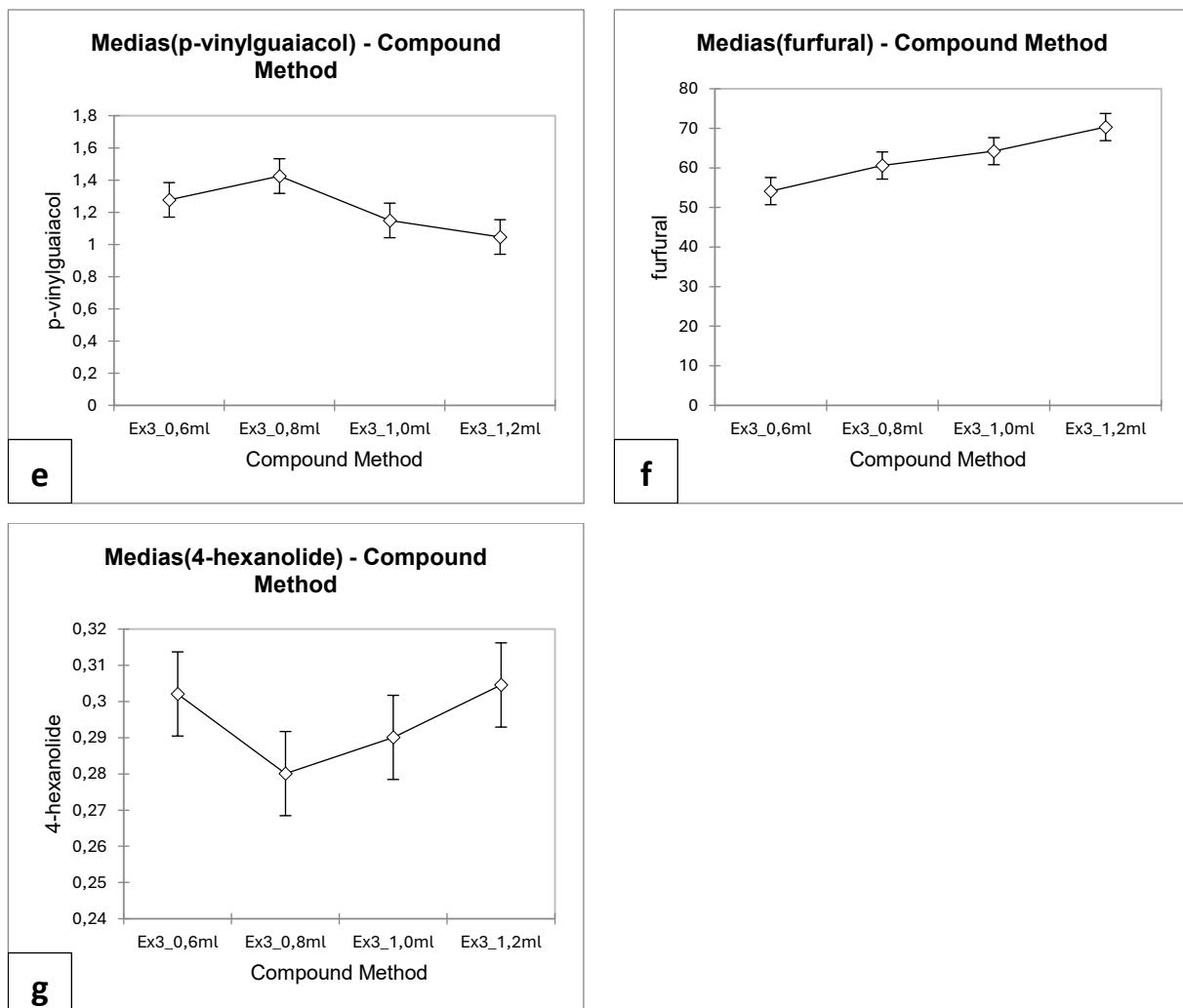


Figura 11. Gráficas de media de áreas cuantificadas frente al volumen de elución empleado. a) 2-acetilpirrolina, b)  $\beta$ -damascenona, c) hexanal, d) 1-hexanol, e) p-vinylguaiacol, f) furfural, g) 4-hexanolida.

## 5.4. Repetibilidad y reproducibilidad

Para comprobar que la metodología desarrollada era correcta, se llevaron a cabo los experimentos de repetibilidad y reproducibilidad. Para la repetibilidad se trabajó con 3 réplicas en un mismo día; para la reproducibilidad se repitió el experimento en 3 días distintos.

Para determinar tanto la repetibilidad como la reproducibilidad se tuvo en cuenta que el DSR% de cada compuesto no superase un 15% para poder dar ambas pruebas como válidas. Los resultados individuales para todos los compuestos identificados en esta prueba aparecen en el Anexo V. En la Tabla 3 se encuentra la lista de compuestos que superaban el 15% DSR, donde se observa que en los compuestos 5-metilfurfural, metil nicotinato, 2-acetilpirrol y arosol, los valores de DSR% para la repetibilidad fueron superiores al 15%; el componente de texanol mostró un DSR% superior al 15% en la reproducibilidad; y el metionol presentó valores de DSR% superiores al 15% en ambos ensayos.

Tabla 3. Compuestos con una DSR% superior a 15 en repetibilidad y/o reproducibilidad.

Compuesto	Repetibilidad	Reproducibilidad
	DSR%	DSR%
5-methylfurfural	16	11
methionol	39	71
methyl nicotinate	15	10
component of texanol	13	24
2-acetylpyrrole	18	14
arosol	17	8

Del total de compuestos analizados, más del 85% presentaron una buena repetibilidad y reproducibilidad. En relación a los compuestos cuyas repetibilidades y/o reproducibilidades superaban el valor límite de DSR%, se decidió que el metionol y el compuesto de texanol se eliminarían de la metodología por ser su cuantificación excesivamente irreproducible. Además, se vio que al realizar estas pruebas, el metional no se conseguía extraer.

En base a los resultados experimentales obtenidos se considera que esta metodología optimizada es capaz de cuantificar de forma reproducible un total de 39 compuestos provenientes del hidrolizado de pulpa de manzana.

## 6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este estudio se ha podido comprobar que las manzanas poseen múltiples precursores del aroma y, que para su análisis, las condiciones aplicadas en la metodología empleada tienen una gran importancia para conseguir recopilar resultados adecuados.

En primer lugar, se ha observado que la etapa de lavado tiene un gran impacto en la concentración en la que se pueden encontrar los compuestos identificados y en la cuantificación de ácidos. Realizar la etapa de lavado con agua destilada conserva una mayor cantidad de compuestos.

En segundo lugar, se consideró óptimo un volumen de carga de 10 mL ya que se comprobó que en 42 analitos no se perdía más de un 10% de los mismos. Además, la elución presenta un resultado más favorable si la mezcla de pulpa hidrolizada recorre únicamente un cartucho.

A continuación, en lo que refiere al volumen de elución, si bien es cierto que en muchos compuestos el volumen de elución no presenta diferencias significativas, es determinante para el correcto análisis de 7 compuestos. Se adoptó una situación de compromiso entre los compuestos que se veían afectados y se eligió un volumen intermedio de los probados: 0,8 mL.

Finalmente, tras concluir los estudios de repetibilidad y reproducibilidad, se puede afirmar que este estudio tiene validez en ambos aspectos para 39 de los compuestos identificados y analizados provenientes del hidrolizado de pulpa de manzana.

Es por todo lo expuesto que se concluye que los parámetros óptimos para llevar a cabo la metodología deben ser: lavado con 1,5 mL de agua destilada, 10 mL como volumen de carga de muestra y 0,8 mL de DCM/5% de MeOH para la elución de cada cartucho.

### Conclusions

*After this study, it has been possible to verify that apple has numerous aroma precursors. For their analysis, the conditions involved in the methodology used are highly important to obtain adequate results.*

*The following conclusions can be drawn from the results of this research:*

*Firstly, the washing step has a great impact on the concentration in which identified compounds can be found as well as the quantification of acids. Performing this phase with distilled water preserves a larger number of components.*

*Secondly, it was considered 10 mL for the optimal sample volume considering that for 42 analytes, no more than 10% of the analytes were lost. In addition, elution shows a better result when the hydrolysed pulp mixture runs through only one cartridge.*

*With regards to elution volume, in spite of the fact that for several compounds the elution volume does not make a significant difference, there are 7 compounds whose elution volume is decisive for their accurate analysis. A compromise situation was adopted between the affected compounds, and an intermediate volume was chosen for those tested: 0,8 mL.*

*Ultimately, once the studies on repeatability and reproducibility were done, it was safe to affirm that for 39 of the identified and analysed, compounds, this study shows validation in both aspects.*

*It is therefore considered that the optimal parameters to conduct the methodology have to be: washing phase with 1.5 mL of distilled water, 10 mL for the sample volume, and 0.8 mL DCM/5% methanol for each cartridge's elution.*

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

Durante el transcurso de este Trabajo Fin de Grado he podido formarme en el funcionamiento de un laboratorio, además de perfeccionar mis técnicas de análisis y aprender acerca de la

dedicación y esfuerzo que hay detrás de cada trabajo realizado en el laboratorio. El tiempo invertido para el desarrollo de este trabajo me ha permitido profundizar mis conocimientos relacionados con la planificación y ejecución de experimentos para el desarrollo de una metodología específica, así como sobre el análisis estadístico de los resultados obtenidos. Por todo ello, considero que la realización de este proyecto va a tener un impacto sustancial de cara a mi futuro desempeño laboral, ya que me ha dotado de una serie de habilidades y competencias que resultarían clave en un potencial trabajo de laboratorio. Gracias a esta experiencia he podido instruirme en el ámbito de la investigación científica, mejorando en mi capacidad de enfrentar diversos desafíos.

Para concluir, quiero aprovechar este apartado para dejar constancia de mi gratitud hacia las directoras del presente proyecto, las investigadoras Bueno Fernández y De la Fuente Blanco, además de todo el personal del Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE) por su amabilidad y disposición.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Alegre, Y., Arias-Pérez, I., Hernández-Orte, P. y Ferreira, V. (2020). "Development of a new strategy for studying the aroma potential of winemaking grapes through the accelerated hydrolysis of phenolic and aromatic fractions (PAFs)". *Food Research International*, 127 DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108728.

Buszewski, B. y Szultka, M. (2012). "Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review". *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), pp. 198–213 DOI: 10.1080/07373937.2011.645413.

Espino-Díaz, M., Sepúlveda, D.R., González-Aguilar, G. y Olivas, G.I. (2016). "Biochemistry of apple aroma: A review". *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), pp. 375–394 DOI: 10.17113/ftb.54.04.16.4248.

Fellman, J.K., Miller, T.W., Mattinson, D.S. y Mattheis, J.P. (2000). "Factors That Influence Biosynthesis of Volatile Flavor Compounds in Apple Fruits". *HortScience*, 35(6), pp. 1026–1033 DOI: 10.21273/HORTSCI.35.6.1026.

Ferreira, V. y López, R. (2019). "The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes". *Biomolecules*, 9(12) DOI: 10.3390/biom9120818.

García, L.A. y Herrero, M. (2010). *Tecnología de la elaboración de sidra. Equipamiento industrial*. Oviedo: SERIDA.

Gonçalves, B., Oliveira, I., Bacelar, E., Morais, M.C., Aires, A., Cosme, F., Ventura-Cardoso, J., Anjos, R., Pinto, T., Gonçalves, B., Oliveira, I., Bacelar, E., Morais, M.C., Aires, A., Cosme, F., Ventura-Cardoso, J., Anjos, R. y Pinto, T. (2018). "Aromas and Flavours of Fruits". En: Vilela, A. (Eds.). *Generation of Aromas and Flavours*. Portugal: IntechOpen, .

Larrivee, M.L. y Poole, C.F. (1994). "Solvation parameter model for the prediction of breakthrough volumes in solid-phase extraction with particle-loaded membranes". *Analytical Chemistry*, 66(1), pp. 139–146 DOI: 10.1021/ac00073a024.

López, R., Aznar, M., Cacho, J. y Ferreira, V. (2002). "Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric

detection". *Journal of Chromatography A*, 966(1-2), pp. 167–177 DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00696-9.

Martín Gavilán, O. y Gómez Juaristi, M. *Técnica Cromatografía de Gases-Masas (GC-MS)*. Disponible en: <https://caj.ucm.es/ciencias-tierra-arqueometria/tecnicas-geologicas/tecnicas/cromatografia-de-gases-masas-gc-ms/38/> [Consultado: 16-04-2025].

Tang, Y., Yao, Y., Wu, Y. y Yang, S. (2025). "The Volatile Composition, Biosynthesis Pathways, Breeding Strategies, and Regulation Measures of Apple Aroma: A Review". *Horticulturae*, 11(3), pp. 310 DOI: 10.3390/horticulturae11030310.

Thermo Fisher Scientific *Solid Phase Extraction Guide*. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/chromatography/chromatography-sample-preparation/sample-preparation-consumables/solid-phase-extraction-consumables/spe-guide.html> [Consultado: 31-05-2025].

Torres Callejero, B. (2023). *Explotación del aroma potencial de frutas autóctonas aragonesas mediante evaluación químico-sensorial*. , Universidad de Zaragoza.

Wells, M.J.M. (2000). "Handling Large Volume Samples: Applications Of SPE To Environmental Matrices". En: Simpson, N.J.K. (Coord.). *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications*. Boca Ratón: CRC Press.

Yang, S., Hao, N., Meng, Z., Li, Y. y Zhao, Z. (2021). "Identification, Comparison and Classification of Volatile Compounds in Peels of 40 Apple Cultivars by HS-SPME with GC-MS". *Foods*, 10(5) DOI: 10.3390/foods10051051.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo I

Anexo I. Compuestos identificados inicialmente en el experimento para el estudio de efecto de lavado con sus tiempos de retención, índice de retención experimental y teórico, número CAS y masas de cuantificación respectivas.

Tiempo	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>teórico</sub>	Nombre del compuesto	CAS	m/z
6,751	<1000	<1000	methyl butanoate	623-42-7	71, 74
7,307	<1000	<1000	acetonitrile	75-05-8	41, 40
7,972	<1000	<1000	trichloromethane	67-66-3	83, 85
8,952	1025	1042	E-2-butenal	4170-30-3	69, 70
10,202	1058	1054	2,3-pentanedione	600-14-6	43, 57, 100
11,270	1087	1083	hexanal	66-25-1	56, 41, 43
14,992	-	-	o-xylene	95-47-6	91, 106
15,627	1149	1142	1-butanol	71-36-3	56, 43
16,691	1163	-	3-methylcyclopentyl acetate	24070-70-0	43, 72, 127
18,921	1191	1200	heptanal	111-71-7	44, 70
19,472	1198	1185	D-limonene	5989-27-5	68, 93
21,122	1215	1208	2-methyl-1-butanol	137-32-6	57, 70
21,703	1221	1229	t-2-hexenal	6728-26-3	41, 55, 69
25,395	1257	1192	3-octanone	106-68-3	57, 72, 99
25,483	1258	1244	1-pentanol	71-41-0	42, 70
26,419	1267	1266	dihydro-2-methyl-3-furanone	3188-00-9	43, 72, 100
27,925	1282	1253±11	ethyl pyruvate	617-35-6	43, 116
28,349	1287	1295	acetoin	513-86-0	45, 43
29,619	1299	1004	furfuryl ethyl ether	-	81, 82
30,008	1304	1303±12	acetol	116-09-6	43, 74

Tiempo	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>teórico</sub>	Nombre del compuesto	CAS	m/z
30,466	1310	1196	1-hepten-3-one	2918-13-0	55, 70
32,927	1343	-	pentane, 3-ethoxy-	36749-13-0	59, 87
33,592	1352	1339	6-methyl-5-hepten-2-one	110-93-0	43, 69, 111
34,936	1370	1379	1-hexanol	111-27-3	56, 55
37,063	1399	1402	nonanal	124-19-6	81, 82
38,682	1433	1421	2-octanol (SI)	123-96-6	45, 55
38,791	1435	1433	E-2-octenal	2548-87-0	55, 70, 83, 97
38,983	1439	1429	α-angelicalactone	591-12-8	43, 55, 98
40,135	1464	1455	methional	3268-49-3	48, 61, 76, 104
40,720	1477	1458	furfural	98-01-1	96, 95
40,972	1482	1477	acetic acid	64-19-7	60, 45
41,321	1490	1466	methyl 3-hydroxybutanoate	1487-49-6	43, 74
41,754	1499	1492	ethylhexanol	104-76-7	57, 98
42,291	1513	1499	acetylfuran	1192-62-7	95, 110
42,823	1527	1515	ethyl 3-hydroxybutyrate	5405-41-4	45, 60
42,877	1528	1525	benzaldehyde	100-52-7	77, 105
43,138	1535	1526	2-methylmercaptoethanol	5271-38-5	61, 92
44,629	1574	1544	3-hydroxy-2-methylbutyric acid, ethyl ester	27372-03-8	74, 102
44,787	1578	1547	methyl levulate	624-45-3	43, 99
44,920	1582	1570	5-methylfurfural	620-02-0	110, 109
45,378	1594	1573±25	4-cyclopentene-1,3-dione	930-60-9	96, 42
46,161	1614	-	1,3-dioxolane-2-acetic acid, 2-methyl-	5735-97-7	87, 43, 131
46,343	1618	1607	ethyl levulate	539-88-8	99, 129
46,869	1632	1640	gamma-butyrolactona	96-48-0	86, 56
47,593	1650	1652	phenylacetaldehyde	122-78-1	91, 92
48,455	1672	1669	furfuralcohol	98-00-0	98, 41, 53, 81
49,080	1687	1674	ethyl 3-hydroxyhexanoate	2305-25-1	117, 71

Tiempo	IR <sub>exp</sub>	IR <sub>teórico</sub>	Nombre del compuesto	CAS	m/z
49,203	1690	1667	2-methylbutyric acid	116-53-0	74, 57
49,469	1697	1717	4-oxoisophorone	1125-21-9	68, 96
49,848	1706	1694	4-hexanolide	695-06-7	85, 56
50,114	1712	1684	butyl 3-hydroxybutyrate	53605-94-0	87, 56, 69
50,591	1724	1738	methionol	505-10-2	61, 106
50,862	1730	1728	ethoxy- $\gamma$ -butyrolactone	932-85-4	85, 58
52,467	1768	1750±7	mephanine	101-41-7	91, 150
52,979	1780	1777	methyl nicotinate	93-60-7	106, 137
53,442	1791	-	6-propylbenzo[1,3]dioxol-5-ylamine	-	150, 179
54,909	1825	1823±14	damascenone	23726-93-4	69, 121
56,730	1868	1863	hexanoic acid	142-62-1	60, 73
57,036	1875	-	component of texanol	77-68-9	71, 89
58,778	1919	1915	$\beta$ -phenylethanol	60-12-8	91, 92
60,959	1980	1973±11	2-acetylpyrrole	1072-83-9	94, 109
61,388	1992	1991	5-formylfurfural	823-82-5	124, 123, 95
62,043	2012	1995±9	furyl hydroxymethyl ketone	17678-19-2	95, 126
62,289	2020	-	2-propoxy-succinic acid	325984-06-3	71, 103, 43
63,510	2061	-	1-(2-thienyl)-1,2-propanedione	13678-69-8	111, 154
65,814	2141	-	1,3-octanediol	23433-05-8	75, 57
66,139	2105	2115±15	arosol	122-99-6	94, 138
67,596	2207	2192	p-vinylguaiacol	7786-61-0	150, 135, 107
68,270	2234	2215±14	3,4-dimethylphenol	95-65-8	107, 122
69,378	2279	2271±27	pyranone	28564-83-2	44, 144, 101
70,264	2315	2306	hemineurine	137-00-8	112, 113, 143
76,384	2595	-	4-methoxy-3-tert-butylphenol	88-32-4	165, 180
78,663	2807	-	bis(1-chloro-2-propyl)(3-chloro-1-propyl)phosphate	137909-40-1	99, 125, 157

## 9.2. Anexo II

Anexo II. Media, desviación estándar y DSR% de los compuestos identificados en el experimento para el estudio de efecto de lavado. El color verde indica si el área absoluta media de "sin lavado" es mayor que "con lavado" y el rojo, aquellos compuestos con  $p < 0,05$ .

Compuesto	CON LAVADO			SIN LAVADO				texp	tcrit 1 cola	p(t una cola)
	media	desviación estándar	DSR%	media	desviación estándar	DSR %				
Hexanal	42342	1148	3	51132	2024	4	5,342	2,920	0,017	
acetol	1223	628	51	53410	2904	5	24,84	2,920	0,001	
methyl butanoate	42437	2637	6	22249	124	1	10,82	2,920	0,004	
2,3-pentanedione	3021	1556	52	30701	103	0	25,11	2,920	0,001	
o-xylene	27957	3021	11	30180	928	3	0,995	2,920	0,212	
1-butanol	15775	146	1	86678	6406	7	15,65	2,920	0,002	
3-methylcyclopentyl acetate	8849	1063	12	47423	431	1	47,55	2,920	0,000	
heptanal	3811	252	7	4182	117	3	1,888	2,920	0,100	
D-limonene	148331	13498	9	165392	13759	8	1,252	2,920	0,169	
2-methyl-1-butanol	28181	1432	5	37161	909	2	7,487	2,920	0,009	
1-pentanol	3282	173	5	3959	94	2	4,859	2,920	0,020	
t-2-hexenal	248802	9244	4	260826	2795	1	1,761	2,920	0,110	
dihydro-2-methyl-3-furanone	9149	1122	12	43826	1296	3	28,61	2,920	0,001	
furfuryl ethyl ether	10982	63	1	12160	239	2	6,736	2,920	0,011	
1-hepten-3-one	21466	531	2	14638	1664	11	5,529	2,920	0,016	
acetoin	5141	520	10	9012	549	6	7,240	2,920	0,009	
ethyl pyruvate	4150	689	17	41175	568	1	58,64	2,920	0,000	
pentane, 3-ethoxy-	1938	125	6	5185	371	7	11,73	2,920	0,004	
6-Methyl-5-hepten-2-one	5528	494	9	6230	410	7	1,547	2,920	0,131	
1-hexanol	94741	1196	1	116735	1290	1	17,68	2,920	0,002	
nonanal	9092	1150	13	10309	655	6	1,301	2,920	0,162	
furfural	8800300	299758	3	10768248	151179	1	8,290	2,920	0,007	
acetic acid	0	0	-	59927	803	1	105,5	2,920	0,000	
methyl 3-hydroxybutyrate	742	315	42	12218	290	2	37,87	2,920	0,000	

Compuesto	CON LAVADO			SIN LAVADO					
	media	desviación estándar	DSR%	media	desviación estándar	DSR %	texp	tcrit 1 cola	p(t una cola)
ethylhexanol	40504	810	2	42536	3806	9	0,739	2,920	0,269
acetyl furan	212578	4654	2	240947	10493	4	3,495	2,920	0,037
ethyl 3-hydroxybutyrate	744644	1338	0	1608689	91537	6	13,35	2,920	0,003
benzaldehyde	61126	3007	5	59225	2545	4	0,682	2,920	0,283
3-hydroxy-2-methylbutyric acid, ethyl ester	3512	200	6	5808	819	14	3,853	2,920	0,031
methyl levulate	5919	1152	19	8851	127	1	3,577	2,920	0,035
5-methylfurfural	373151	34540	9	433317	17251	4	2,204	2,920	0,079
4-cyclopentene-1,3-dione	12784	1064	8	25557	1153	5	11,51	2,920	0,004
1,3-dioxolane-2-acetic acid, 2-methyl	20336	1060	5	28526	1050	4	7,764	2,920	0,008
ethyl levulate	17648	771	4	20983	977	5	3,791	2,920	0,032
phenylacetaldehyde	268445	44819	17	363964	16891	5	2,820	2,920	0,053
furfuralcohol	8972	1597	18	51774	2017	4	23,53	2,920	0,001
ethyl 3-hydorxyhexanoate	31469	387	1	44259	5740	13	3,144	2,920	0,044
2-methylbutyric acid	0	0	-	91751	8482	9	15,30	2,920	0,002
4-oxoisophorone	4728	335	7	6467	506	8	4,056	2,920	0,028
4-hexanolide	76276	3463	5	89019	1442	2	4,804	2,920	0,020
butyl 3-hydroxybutyrate	17139	309	2	25638	1944	8	6,106	2,920	0,013
methionol	20382	10834	53	39122	1510	4	2,423	2,920	0,068
ethoxy-gamma-butyrolactone	15025	194	1	15010	655	4	0,031	2,920	0,489
mephaneine	22964	2066	9	25399	80	0	1,666	2,920	0,119
methyl nicotinate	45824	2280	5	53007	1681	3	3,586	2,920	0,035
6-propylbenzo[1,3]dioxol-5-ylamine	13966	933	7	16130	799	5	2,491	2,920	0,065
beta-damascenone	61975	5384	9	70168	5555	8	1,498	2,920	0,136
hexanoic acid	0	0	-	95804	13095	14	10,35	2,920	0,005
component of texanol	18757	4640	25	25734	2311	9	1,904	2,920	0,099
b-phenylethanol	276007	2437	1	377343	34947	9	4,091	2,920	0,027
2-acetylpyrrole	11154	1518	14	14231	597	4	2,668	2,920	0,058

Compuesto	CON LAVADO			SIN LAVADO					
	media	desviación estándar	DSR%	media	desviación estándar	DSR %	texp	tcrit 1 cola	p(t una cola)
5-formylfurfural	347644	36928	11	421451	29590	7	2,206	2,920	0,079
furyl hydroxymethyl ketone	238339	41221	17	6034407	390595	6	20,87	2,920	0,001
2-propoxy-succinic acid	147066	5155	4	335088	7474	2	29,29	2,920	0,001
1,3-octanediol	16824955	34881	0	13359425	477525	4	10,24	2,920	0,005
arosol	806911	7440	1	851010	26724	3	2,248	2,920	0,077
p-vinylguaiacol	262119	22291	9	453966	23156	5	8,441	2,920	0,007
pyranone	9087	93	1	414859	18184	4	31,56	2,920	0,001
hemineurine	293006	5509	2	230631	10479	5	7,451	2,920	0,009
4-methoxy-3-tert-butylphenol	17690550	549731	3	17046707	525029	3	1,198	2,920	0,177
bis(1-chloro-2-propyl)(3-chloro-1-propyl)phosphate	71397	929	1	74585	2562	3	1,655	2,920	0,120
E-2-butenal	16248	4607	28	71556	2500	3	14,92	2,920	0,002
E-2-octenal	8102	916	11	4120	343	8	5,756	2,920	0,014
alpha-angelicalactone	1884	258	14	32163	228	1	124,3	2,920	0,000
methional	1807	507	28	3371	252	7	3,907	2,920	0,030
2-methylmercaptoethanol	23	32	141	6127	77	1	103,6	2,920	0,000
gamma-butyrolactone	193	82	42	2626	2112	80	1,628	2,920	0,123
1-(2-thienyl)-1,2-propanedione	234177	17325	7	313310	25987	8	3,583	2,920	0,035

### 9.3. Anexo III

Anexo III. Porcentaje de área de cada compuesto identificado en el experimento relativo al volumen de ruptura en relación con el área del control y logP correspondiente. Las casillas azules indican los compuestos que presentan olor. Las casillas en rojo indican una pérdida de compuesto superior al 10%. Un guion (-) en las casillas de porcentaje de área significa que no se encontró el compuesto ni en el control ni en las fracciones recogidas.

Compuesto	logP	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
hexanal	1,97	0	0	0	0	0	8	15	16	22	30
acetol	-0,78	114	104	103	98	94	104	106	117	116	116
methyl butanoate	1,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,3-pentanedione	-0,8	0	34	45	61	88	103	126	161	165	184
o-xylene	3,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-butanol	0,88	19	66	89	92	99	100	110	109	111	127
3-methylcyclopentyl acetate		0	66	73	58	80	84	110	117	111	131
heptanal	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-limonene	4,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-methyl-1-butanol	1,22	0	20	15	43	73	87	111	124	134	145
1-pentanol	1,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t-2-hexenal	1,58	0	0	0	0	0	0	6	9	13	18
dihydro-2-methyl-3-furanone	-0,65	9	48	74	80	99	105	112	119	125	127
furfuryl ethyl ether	1,65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1-hepten-3-one	1,63	0	0	0	0	33	33	48	46	59	68
acetoin	-0,43	98	101	97	90	95	100	100	107	109	112
ethyl pyruvate	0,05	32	64	80	81	91	106	122	155	149	151
pentane, 3-ethoxy-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Methyl-5-hepten-2-one	2,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-hexanol	1,94	0	7	7	8	14	17	25	37	49	64
nonanal	3,56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
furfural	0,73	2	21	37	51	82	96	108	116	124	124
acetic acid	-0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
methyl 3-hydroxybutyrate	-0,55	0	86	103	98	94	101	105	109	114	120

Compuesto	logP	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
ethylhexanol	2,82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
acetylfuran	0,52	0	7	13	19	37	51	74	92	113	126
ethyl 3-hydroxybutyrate	-0,02	4	31	51	69	99	111	124	130	131	145
benzaldehyde	1,64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3-hydroxy-2-methylbutyric acid, ethyl ester	0,33	0	0	0	0	0	50	98	137	153	191
methyl levulate	-0,13	0	0	0	0	65	92	114	131	151	156
5-methylfurfural	1,19	3	9	12	14	24	31	44	59	74	87
4-cyclopentene-1,3-dione	0	0	29	43	77	92	108	120	134	136	
1,3-dioxolane-2-acetic acid, 2-methyl	0	0	0	0	0	44	78	106	127	151	
ethyl levulate	0,4	0	0	0	0	0	0	43	62	89	103
phenylacetaldehyde	1,78	0	0	0	0	14	17	28	51	60	86
furfuralcohol	0,2	16	72	95	94	100	103	109	115	115	130
ethyl 3-hydorxyhexanoate	1,04	0	0	0	0	0	14	22	35	49	67
2-methylbutyric acid	1,13	0	0	0	0	58	76	103	131	140	185
4-oxoisophorone	0,76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4-hexanolide (gamma-caprolactone)	0,26	0	0	0	0	47	63	86	108	127	142
butyl 3-hydroxybutyrate	1,04	0	0	0	0	0	8	19	35	46	60
methionol	0,4	0	21	32	52	83	95	109	115	114	131
ethoxy-gamma-butyrolactone		32	40	45	40	62	71	103	120	139	166
mephaneine	1,97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
methyl nicotinate	0,88	0	0	0	0	0	0	13	21	33	42
6-propylbenzo[1,3]dioxol-5-ylamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
beta-damascenone	4,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
hexanoic acid	1,84	0	0	0	0	11	9	22	34	43	72
component of texanol	2,57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b-phenylethanol	1,36	6	7	7	9	16	19	29	43	57	75
2-acetylpyrrole	0,88	0	0	0	0	0	1	3	4	5	6
5-formylfurfural	0,36	41	102	126	127	132	126	126	112	113	118
furyl hydorxymethyl ketone		5	37	66	78	85	99	110	125	125	128

Compuesto	logP	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
2-propoxy-succinic acid		0	15	27	42	72	94	119	143	153	166
1,3-octanediol	1,43	0	0	0	0	18	27	49	76	104	150
arosol	1,16	0	1	2	4	12	15	25	38	52	63
p-vinylguaiacol	1,93	0	0	2	3	6	8	10	13	15	19
pyranone	-0,42	54	135	133	127	135	162	191	250	229	229
hemineurine	0,04	0	20	28	44	66	79	81	94	100	108
4-methoxy-3-tert-butylphenol		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
bis(1-chloro-2-propyl)(3-chloro-1-propyl)phosphate		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E-2-butenal	0,51	8	38	56	70	92	99	102	112	116	117
E-2-octenal	2,64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2-octanol (SI)		0	0	0	0	0	0	4	4	5	5
alpha-angelicalactone	0,84	0	13	24	32	63	80	98	115	129	131
methional	0,71	0	0	0	0	47	82	109	153	169	199
2-methylmercaptoethanol	0,09	16	82	89	94	105	113	120	124	125	134
gamma-butyrolactone	-0,76	50	87	83	80	92	97	105	108	65	112
1-(2-thienyl)-1,2-propanedione	0,42	0	0	0	0	1	7	13	19	26	33

## 9.5. Anexo IV

Anexo IV. Valores F y P obtenidos de cada compuesto en el experimento para el estudio del volumen de eluyente (DCM/5% de MeOH) y su significancia.

Compuesto	valor F	valor P	Significativo
E-2-butenal	4,222	0,099	No
2,3-pentanedione	1,125	0,439	No
Hexanal	6,595	0,050	Sí
heptanal	0,136	0,933	No
2-methyl-1-butanol	2,037	0,251	No
t-2-hexenal	0,598	0,649	No
dihydro-2-methyl-3-furanone	5,364	0,069	No
furfuryl ethyl ether	1,140	0,434	No
1-hepten-3-one	0,381	0,773	No
1-hexanol	10,752	0,022	Sí
nonanal	2,570	0,192	No
E-2-octenal	0,654	0,621	No
alpha-angelicalactone	0,200	0,892	No
furfural	30,125	0,003	Sí
methyl 3-hydroxybutyrate	2,979	0,160	No
acetyl furan	1,512	0,340	No
benzaldehyde	1,068	0,456	No
ethyl 3-hydroxybutyrate	0,254	0,855	No
3-hydroxy-2-methylbutyric acid, ethyl ester	1,779	0,290	No
methyl levulate	0,607	0,645	No
5-methylfurfural	0,522	0,690	No
ethyl levulate	2,326	0,216	No
phenylacetaldehyde	1,727	0,299	No
4-oxoisophorone	2,880	0,167	No
2-methylbutyric acid	0,497	0,704	No
4-hexanolide	7,334	0,042	Sí
butyl 3-hydroxybutyrate	0,652	0,622	No
methionol	2,443	0,204	No
mephanine	1,231	0,408	No
methyl nicotinate	2,926	0,163	No
beta-damascenone	28,634	0,004	Sí
component of texanol	0,611	0,643	No
hexanoic acid	0,852	0,534	No
b-phenylethanol	4,482	0,091	No
2-acetylpyrrole	8,227	0,035	Sí
1-(2-thienyl)-1,2-propanedione	1,062	0,458	No
1,3-octanediol	1,087	0,450	No
arosol	3,942	0,109	No
p-vinylguaiacol	17,837	0,009	Sí
hemineurine	1,259	0,400	No

## 9.6. Anexo V

Anexo V. DSR% correspondientes a las muestras para el estudio de repetibilidad y reproducibilidad.

Compuesto	Repetibilidad % DSR	Reproducibilidad %DSR
Hexanal	13	6
2,3-pentanedione	13	10
heptanal	10	12
2-methyl-1-butanol	15	5
t-2-hexenal	11	5
dihydro-2-methyl-3-furanone	14	15
furfuryl ethyl ether	13	14
1-hepten-3-one	13	8
1-hexanol	0	10
nonanal	5	13
furfural	12	8
methyl 3-hydroxybutyrate	6	10
acetyl furan	13	7
ethyl 3-hydroxybutyrate	4	1
benzaldehyde	6	14
3-hydroxy-2-methylbutyric acid, ethyl ester	3	9
methyl levulate	9	11
5-methylfurfural	16	11
ethyl levulate	3	10
phenylacetaldehyde	7	2
ethyl 3-hydroxyhexanoate	14	6
2-methylbutyric acid	11	4
4-oxoisophorone	8	8
4-hexanolide	5	1
butyl 3-hydroxybutyrate	8	1
methionol	39	71
mephaneine	4	8
methyl nicotinate	15	10
beta-damascenone	7	8
hexanoic acid	9	8
component of texanol	13	24
b-phenylethanol	14	3
2-acetylpyrrole	18	14
1,3-octanediol	15	5
arosol	17	8
p-vinylguaiacol	9	8
hemineurine	13	14
E-2-butenal	15	13
E-2-octenal	2	0
2-octanol (SI)	0	0
alpha-angelicalactone	11	4
methional	-	-
1-(2-thienyl)-1,2-propanedione	13	11