

Trabajo Fin de Grado

Evaluación olfatométrica de productos de
interés aromático

Olfactometric evaluation of odorous products

Autor

Blanca Fernández Gómez

Director

Ricardo López Gómez

Facultad de Ciencias

2017

Contenido

1.	Resumen.....	2
1.1.	Resumen.....	2
1.2.	Abstract	2
2.	Introducción	3
2.1.	Aromas del vino.....	3
2.2.	Cromatografía de gases-olfatometría (GC-O)	4
2.3.	Aplicaciones de GC-O	4
3.	Objetivos	6
4.	Materiales y métodos	7
4.1.	Muestras.....	7
4.2.	Reactivos y materiales.....	8
4.3.	Cromatografía de gases-olfatometría (GC-O)	8
4.3.1.	Preparación de extractos representativos	8
4.3.2.	Condiciones cromatográficas (GC-O)	9
4.3.3.	Realización de un blanco de método	11
4.4.	Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)	11
4.5.	Cromatografía de gases-Multidimensional	12
4.6.	Tratamiento de datos.....	13
4.6.1.	Estimación de índices de retención.....	13
4.6.2.	Calculo de frecuencias modificadas (FM%).....	13
5.	Resultados y discusión	15
5.1.	Vino tinto.....	16
5.2.	Vino blanco.....	20
6.	Conclusiones.....	23
7.	Bibliografía	24

1. Resumen

1.1. Resumen

En el presente trabajo se ha utilizado la cromatografía de gases olfatometría (GC-O) como técnica analítica principal para la realización del estudio aromático de dos muestras de vino con aromas diferentes (tinto y blanco) con el último objetivo de determinar si los atributos aromáticos percibidos en un análisis sensorial anterior son fruto de una sola molécula aromática (molécula aromática de impacto) o, por el contrario, son el resultado de la combinación de aromas generados por varias moléculas aromáticas. Como paso previo al uso de esta técnica se ha realizado la extracción y concentración de los compuestos aromáticos, usando las técnicas que se han considerado más adecuadas para el posterior análisis. Una vez obtenido el perfil aromático de los dos vinos, se ha procedido al uso de técnicas analíticas complementarias (Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas GC-MS y Cromatografía de Gases Multidimensional MDGC) junto con el tratamiento de los datos obtenidos para la correcta identificación de los compuestos que se consideran activos aromáticamente. Por último, realizado el estudio se extrajo como conclusión primordial que los aromas percibidos en los correspondientes análisis sensoriales no eran consecuencia de una sola molécula aromática, si no que eran combinación de varias de ellas que, actuando de manera conjunta, justificaban el aroma final y las notas percibidas por los jueces.

1.2. Abstract

In the present work, gas chromatography olfactometry (GC-O) has been used as the main analytical technique to carry out the aromatic study of two samples of wine with different aromas (red and white) with the main objective of determining if the aromatic attributes perceived in a previous sensorial analysis are the result of a single aromatic molecule (impact odorant) or, on the contrary, they are the result of the combination of aromas generated by several aromatic molecules. As a preliminary step to the use of this technique, the extraction and concentration of the aromatic compounds have been carried out, using the techniques that have been considered more suitable for the subsequent analysis. Once the aromatic profile of the two wines was obtained, complementary analytical techniques (Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC-MS and Multidimensional gas chromatography MDGC) were used together with the treatment of the data obtained for the correct identification of the compounds which are considered aromatically active. Finally, the study lead to the conclusion that that the perceived aromas in the corresponding sensory analyses were not the consequence of a single aromatic molecule, but instead a combination of several molecules, that acting together, justified the final aroma perceived by the judges.

2. Introducción

2.1. Aromas del vino

En la mayoría de los casos los vinos no tienen un aroma característico simple, sino que tienen una paleta de sutiles aromas que son difíciles de definir. Tal complejidad sensorial es causada por la complejidad química del aroma del vino, que puede verse influida tanto por las uvas de partida, como por las condiciones de fermentación y crianza. En la fermentación alcohólica, además del etanol, aparecen una serie de subproductos como, por ejemplo, carbonilo, alcoholes, ésteres, ácidos y acetales, todos ellos influyentes en el producto acabado.

La composición y los niveles de concentración de los subproductos pueden variar ampliamente. Algunos compuestos aparecen en altas concentraciones (cientos de mg/L), sin embargo, una gran parte aparece a niveles significativamente más bajos (incluso tan bajos como ng/L). La influencia de los compuestos individuales en el perfil olfatométrico puede ser muy diferente. Con bastante frecuencia, los compuestos que aparecen en cantidades traza tienen un mayor impacto en las propiedades sensoriales de los productos alcohólicos que los que aparecen en altas concentraciones ^[1].

La mayoría de los vinos no presentan compuestos aromáticos de impacto, es decir, un único compuesto aromático que define el aroma del vino, sino que contienen un número relativamente grande de odorantes activos que contribuyen en mayor o menor medida a los diferentes matices de aroma del vino ^[2-4].

El vino contiene miles de moléculas diferentes, y un número muy elevado de ellas está formado por moléculas volátiles. Muchas de estas moléculas volátiles pueden tener propiedades sensoriales, pero sólo un número limitado de sustancias volátiles se pueden encontrar en vinos en concentraciones lo suficientemente altas como para ser percibidas. Estos compuestos son los que tendrán una gran influencia en las características aromáticas del vino y, por tanto, son los que habrán de ser analizados y considerados más a fondo en los estudios sensoriales.

La presencia simultánea de diferentes familias de compuestos químicos, con aromas muy diversos hace que la percepción final sea el resultado de la interacción de los aromas formando así una percepción nueva y diferente.

Dado que todas las moléculas de aroma son más o menos volátiles, la técnica más adecuada para filtrar las moléculas activas del olor del resto de moléculas es la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O). Esta técnica hace uso de la nariz humana como detector para los compuestos que se eluyen de la columna cromatográfica.

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

La cromatografía de gases-olfatometría (GC-O) se emplea comúnmente para localizar compuestos aromáticamente activos en alimentos y bebidas. En esta técnica, los compuestos aromáticos son separados y dirigidos tanto a un detector instrumental como a la nariz humana. Esta doble detección facilita las tareas de reconocimiento y evaluación de la intensidad del olor, sobre todo porque la nariz humana resulta en ocasiones mucho más sensible que cualquier detector instrumental. Por lo tanto, es una excelente técnica de cribado para la evaluación de sustancias volátiles aromáticas presentes en un producto ^[5, 6].

La evaluación cualitativa y cuantitativa del olor se realiza para cada analito que eluye de la columna cromatográfica. Esto permite establecer si un determinado compuesto es activo sensorialmente a una concentración dada (es decir, si aparece en la muestra a un nivel superior al umbral de detección sensorial) y cuál es su olor, así como la determinación del tiempo de actividad sensorial y la intensidad del olor. La evaluación del olor del analito es posible gracias a la presencia de un accesorio especial, denominado puerto olfatómico, conectado en paralelo a detectores convencionales, como detector de ionización de llama (FID) o espectrómetro de masas (MS). El flujo del eluyente se divide de tal manera que los analitos alcancen simultáneamente ambos detectores, por lo que ambas señales pueden compararse en función del tiempo retención.

Una vez realizada la olfatometría, obtenemos el perfil olfatómico, que consiste en un listado jerarquizado de las moléculas odorantes relevantes desde el punto de vista del aroma y que nos sirve para entender la relación que existe entre las propiedades sensoriales de un producto y su composición química. Las moléculas que componen dicho perfil son las que explican el aroma característico de la muestra de estudio.

Los resultados de GC-O se correlacionan a menudo con los resultados de la evaluación sensorial convencional realizada en paralelo. El análisis sensorial de las muestras individuales proporciona descriptores que caracterizan su olor. El análisis cromatográfico con detección olfatómica permite determinar qué compuestos son responsables de los descriptores individuales.

Una comparación de olfatogramas con cromatogramas obtenidos con el uso de detectores tales como FID o MS revela a menudo que los compuestos que producen señales grandes con los detectores convencionales son débilmente detectables en el eluyente de la columna y viceversa. A veces, los compuestos detectados con la nariz como picos en un olfatograma no son en absoluto detectables con detectores convencionales, lo que demuestra la enorme sensibilidad de la nariz humana.

2.3. Aplicaciones de GC-O

Numerosos son los compuestos volátiles aromáticos que están presentes en productos variados como pueden ser los alimentos y las bebidas. La composición química de cada producto depende entre otros factores de las condiciones en las que se ha llevado el

proceso de elaboración o de conservación, según sea el caso, y es el resultado de procesos enzimáticos, microbiológicos y / o térmicos. La cromatografía de gases con detección olfatométrica puede utilizarse para estudiar la evolución del aroma de las bebidas alcohólicas, así como la influencia de factores individuales, como el tipo de levadura utilizada para la fermentación. El perfil de olor de una bebida alcohólica puede proporcionar información importante para la mejora y optimización de las condiciones del proceso de producción ^[6].

Además de la obtención de los perfiles aromáticos del producto que se quiere caracterizar, la GC-O tiene otras aplicaciones importantes, como identificar la/s molécula/s responsables de un olor no deseado (off-flavor). Este es el caso de la determinación de 4-etilfenol y 4-etilguaicol en vinos tintos contaminados con levaduras *Dekkera/Brettanomyces* ^[7], de la presencia de la geosmina producida por la bacteria *Streptomyces*, causante del olor a tierra o moho en agua potable, frutas y verduras ^[8] y el estudio de posibles contaminantes con olor en plásticos^[9]. Asimismo se ha usado en numerosas ocasiones para identificar nuevos odorantes ^[10-12].

En resumen, la técnica GC-O es una técnica asentada y con una gran diversidad de aplicaciones, no solo en el estudio de vinos o bebidas alcohólicas en general, si no en cualquier producto que pueda tener cierto interés aromático. Como ejemplos tenemos la elucidación del perfil aromático del rábano picante ^[13], en albaricoques ^[14], en embutidos ^[15].

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la elucidación del perfil aromático de dos muestras de vino, seleccionadas previamente por presentar un aroma interesante. Se trata de un vino tinto, con marcadas notas a frutos rojos y cereza, y un vino blanco con intenso aroma a pera. La estrategia que se ha seguido para abordar el aroma de estos dos vinos ha consistido en la aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O).

Por otro lado, como objetivos secundarios, se pueden señalar los siguientes:

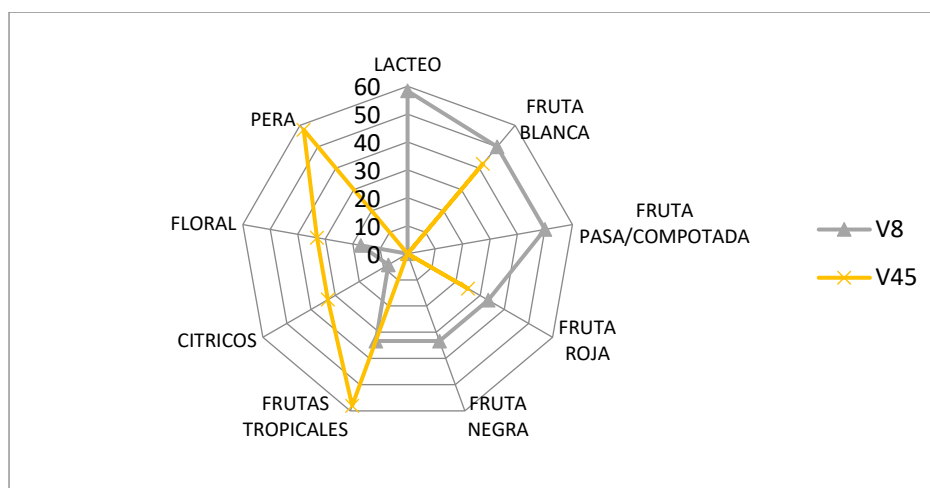
- Identificar de forma inequívoca los principales compuestos aromáticos detectados en el perfil de los dos vinos estudiados.
- Evaluación de los resultados obtenidos a través de la identificación de los aromas responsables del aroma característico de cada vino con los métodos mencionados anteriormente.
- Determinación semicuantitativa de los compuestos identificados, la cual ha sido posible gracias al uso de la técnica GC-MS.

4. Materiales y métodos

4.1. Muestras

Como vinos de partida se ha escogido uno blanco y uno tinto, por presentar aromas curiosos e interesantes de abordar en este estudio. El primero de los vinos presentaba un intenso aroma a pera (código V45) y, el segundo, destacó por su aroma a frutas rojas (fresa y cereza), (código V8).

Figura 1. Perfil aromático de ambos vinos tras evaluación sensorial, expresado en unidades de frecuencia modificada (FM %)



En la Figura 1 se muestra la telaraña de descriptores sensoriales de los 2 vinos medidos como frecuencia modificada (%FM), que nos da un valor de la frecuencia de aparición y de la intensidad de cada descriptor, construida a partir de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial llevada a cabo por un panel de expertos, todos ellos integrantes del Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (LAAE). Esta gráfica pone de manifiesto de forma clara y muy visual lo diferentes que son entre sí los 2 vinos a nivel aromático. Por un lado, el vino blanco V8 destaca, sobre todo, por una alta intensidad en las notas lácteo (60% FM), fruta blanca (50% FM), fruta pasa/compota (50% FM) y fruta roja y negra (32% FM en ambos descriptores). El vino tinto (V45) se caracteriza por notas muy intensas a pera y frutas tropicales principalmente (60% FM en ambos).

4.2. Reactivos y materiales

Los reactivos que se han empleado en el trabajo son los siguientes:

- Diclorometano de calidad Chromasolv (Fisher Chemical, Pittsburgh, PA, EE.UU.).
- Metanol de calidad OmniSolv (Fisher Chemical).
- Resinas LiChrolut EN (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Cartuchos de polipropileno y frits (Merck).
- Butirato de hexilo (Sigma, St. Louis, EE.UU.), patrón usado como estándar interno.
- N-alcanos, mezcla de alcanos C7-C30, 1000 µg/mL de cada componente disueltos en hexano (Merck).
- Ácido L (+)-tartárico para análisis (Panreac, Barcelona, España).
- Etanol de calidad LiChrosolv (Merck).
- Agua MilliQ

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

Para poder evaluar el perfil aromático de un vino a través de la cromatografía de gases-olfatometría el primer paso es obtener un extracto que sea representativo del vino de partida y lo suficientemente concentrado como para obtener resultados satisfactorios.

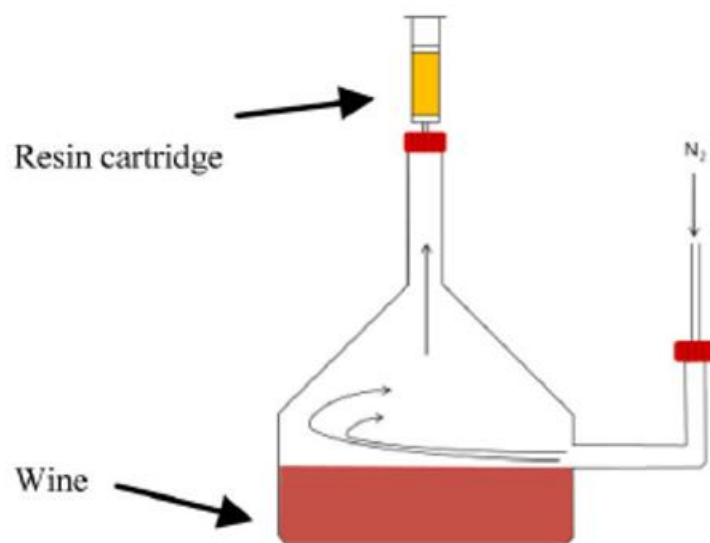
4.3.1. Preparación de extractos representativos

El extracto de vino a analizar se obtuvo mediante una técnica basada en espacio de cabeza dinámico acoplada a un cartucho de extracción en fase sólida (DHS-SPE), la cual consiste en hacer pasar una corriente de gas inerte a través del espacio de cabeza del recipiente en el cual se encuentra el vino de estudio (Figura 2) que arrastra los volátiles y los dirige a un cartucho de SPE, de manera que se quedan retenidos en este sorbente.

Este prototipo ha sido desarrollado y validado por nuestro grupo de investigación ^[16]. Sin embargo, para poder llegar a este diseño óptimo fue necesario un gran trabajo experimental en el que se probaron diferentes prototipos, y diferentes condiciones, tal y como se explica en ^[17].

Usamos esta técnica porque el extracto debe reflejar lo más posible la composición de los vapores que llegan a los receptores olfativos, durante la olfacción normal algunas moléculas de aroma son transportadas muy eficientemente desde el producto hasta el receptor olfativo, mientras que otras, usualmente las menos volátiles y más polares si el producto es acuoso, se transportan sólo en proporciones insignificantes. Este sistema simula lo que ocurre cuando olemos una copa de vino, los compuestos aromáticos son arrastrados y retenidos en el cartucho de resina en la misma proporción que llegan a nuestros receptores olfativos, de esta forma conseguimos extractos representativos.

Figura 2. Sistema de extracción de compuestos aromáticos ^[16]



En comparación con las técnicas convencionales de extracción exhaustiva, esta técnica tiene el beneficio de no causar generalmente la pérdida de los compuestos más volátiles, que a menudo tienen la mayor influencia en el olor de la muestra.

En primer lugar, se tiene que preparar el cartucho de SPE con las resinas LiChrolut EN. Se usa un cartucho de polipropileno para extracción sólida (SPE) con dimensiones de 0,8 cm de diámetro interno y 3 mL de capacidad y se llena con una masa de 400 mg de resina LiChrolut EN ^[18].

Este cartucho, previamente a su uso, se lava con 20 mL de diclorometano y, posteriormente, se deja secar a vacío (presión negativa de 0,6 bar) durante 10 min. Pasado este tiempo, se procede a su colocación en la salida del recipiente en el cual se encuentra el vino (80 mL). Se trabaja a temperatura ambiente y se aplica una corriente de nitrógeno de flujo perfectamente controlado (500 mL/min) durante 100 min.

Una vez transcurrido este periodo, se retira el cartucho y para su secado se hace pasar corriente de nitrógeno durante otros 10 min para eliminar el posible contenido de agua. Una vez seco, se eluye el cartucho con 3,2 mL de una disolución de diclorometano/metanol (95:5). Eluido el cartucho, se añade 40 µL de estándar interno (butirato de hexilo, 30 mg/L) y, para realizar la concentración del extracto hasta los 200 µL, se vierte en un micro concentrador Kuderna-Danish ^[19] y, seguidamente, se le aplica una suave corriente de nitrógeno, cada poco tiempo, con una pipeta Pasteur para favorecer la homogeneidad en el extracto.

4.3.2. Condiciones cromatográficas (GC-O)

Las condiciones de trabajo para llevar a cabo el estudio olfatométrico fueron las siguientes: el cromatógrafo usado fue un GC Trace de ThermoQuest equipado con un detector FID y un puerto olfativo (ODO-1 de SGE) conectado a un divisor de flujo a la salida de la columna. Se usó una columna polar, DB-WAX de J&W (Folsom, CA, EE.UU.) cuyas

dimensiones eran de 30 m x 0,32 mm de diámetro interno y con 0,5 μm de espesor de fase. Posteriormente se mantuvo una presión constante de 52 kPa durante el análisis, siendo el gas portador H_2 . Estas mismas condiciones se han usado en trabajos anteriores del grupo ^[20].

El diseño de todos los puertos olfatométricos comercialmente disponibles es muy similar; el eluido, suministrado al puerto a través de una línea de transferencia, es olido en un vidrio ajustado a la forma de una nariz. La línea de transferencia se calienta para evitar la condensación de analitos semivolátiles en las paredes del capilar. Se añade gas auxiliar (aire húmedo) al eluido para evitar el secado de las membranas mucosas de la nariz del personal de evaluación, ya que esto podría causar incomodidad, especialmente en análisis más largos. El puerto olfatométrico tiene que estar situado de forma que el juez pueda estar en una posición cómoda el tiempo de análisis.

A continuación, se inyectó 1 μL del extracto obtenido en modo splitless durante un minuto, siendo el programa de temperaturas del horno el siguiente: 40 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, con un incremento posterior de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los 100 $^{\circ}\text{C}$ seguido de otro incremento de 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los 220 $^{\circ}\text{C}$, temperatura que se mantuvo durante 10 min más.

Cada una de las olfatometrías se llevó a cabo por un panel de 6 sniffers o jueces, los cuales tienen que anotar tres aspectos relevantes: el tiempo al que detectan un aroma, su descriptor y, por último, la intensidad percibida, usando una escala comprendida entre 0 y 3, y permitiéndose valores intermedios. La duración de la prueba es de 40 min, dividiéndose en dos partes con el fin de evitar la saturación de los sniffers.

Debe recordarse que la nariz humana es el detector en la técnica discutida, por tanto, hay que minimizar los factores que puedan influir en su evaluación, tales como olores externos o ruidos, además debe mantenerse un ambiente de temperatura constante dentro del laboratorio.

Para el cálculo de los índices de retención de cada compuesto, se inyectó una disolución de una mezcla de alcanos en las mismas condiciones cromatográficas.

Cuando se han obtenido todos los datos de los panelistas procedemos a agrupar dichos datos según el tiempo de retención y descriptores similares. Compuestos con tiempos de retención iguales y descriptores parecidos pertenecen a la misma zona odorante y consideramos que se trata del mismo compuesto aromático.

Realizado este agrupamiento, procedemos a calcular la frecuencia modificada (FM%) de cada zona odorante, considerando que las zonas con una FM% inferior a 30 no participan en el aroma percibido en el análisis sensorial y, por tanto, pueden ser descartadas a priori.

El siguiente paso es calcular los índices de retención de las zonas que nos han proporcionado una frecuencia modificada superior a 30. Para calcular los índices de retención lineales, utilizamos la fórmula proporcionada en el apartado 4.6.1. Una vez calculados y con los descriptores proporcionados por los jueces, realizamos una primera búsqueda en bases de datos tanto del propio laboratorio como externas (Flavornet y Pherobase), que nos proporciona una lista de posibles compuestos.

Obtenida la lista reducida de compuestos y con los índices de retención calculados, procedemos a identificar dichos compuestos en los espectros obtenidos mediante cromatografía de gases-masas (GC-MS).

4.3.3. Realización de un blanco de método

Preparar una muestra blanco y analizarla nos permite evaluar si alguno de los pasos involucrados en la etapa de preparación del extracto apto para GC-O nos genera señales adicionales, que suponen una contaminación que habrá que tener en cuenta. Para ello se preparó un vino sintético similar a nuestras muestras de vino. Dicho vino sintético trata de una disolución acuosa a la cual añadimos etanol hasta conseguir que su contenido alcohólico sea del 12% (v/v) y también ácido tartárico para igualar su pH al del vino (pH=3,5).

Una vez preparado nuestro vino sintético lo sometemos a los mismos pasos de preparación de extractos y concentración que sufriría la muestra, y lo inyectamos en las mismas condiciones.

4.4. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)

Los análisis se realizaron con un cromatógrafo Varian 450-GC (Varian, Sunnyvale, CA, EE.UU.) acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas de trampa iónica Saturn 2200 suministrado por Varian. Una columna capilar DB-WAXETR (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm d.i. con un espesor de fase de 0,25 μ m, precedida de una precolumna sin recubrimiento (polaridad intermedia, desactivada) de 3 m x 0,25 mm suministrada por Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.). El gas portador fue He con un caudal de 1 mL/min.

Para este apartado, se inyectaron 2 μ L del extracto con un programa de temperaturas del horno diferente al anterior ya que se mantuvo unos 35 $^{\circ}$ C durante 3 min a los que se fue aumentando 2 $^{\circ}$ C/min hasta alcanzar los 220 $^{\circ}$ C para finalmente agregar progresivamente otros 20 $^{\circ}$ C/min hasta alcanzar los 240 $^{\circ}$ C, una temperatura que se mantuvo durante otros 30 min. En el inyector también se utilizó un programa de temperaturas consistente en 40 $^{\circ}$ C durante 0,05 min con un aumento progresivo hasta 300 $^{\circ}$ C durante 50 min, una vez alcanzada esta temperatura se produce una bajada hasta 200 $^{\circ}$ C, temperatura que se mantiene 68 min. La temperatura de la línea de transferencia y de la cámara de ionización fue de 200 $^{\circ}$ C, y la corriente de emisión de la trampa de iones fue de 80 μ A. Durante todo el proceso de medida se utilizó el equipo en el modo de escaneo completo (m/z 35-220). La adquisición de señal comenzó en el minuto 9,90 y se alargó hasta el minuto 125.

Para poder localizar los compuestos en los espectros obtenidos, se inyectó una mezcla de alcanos en las mismas condiciones.

4.5. Cromatografía de gases-Multidimensional

Se ha utilizado un cromatógrafo gas multidimensional de Varian (Walnut Creek, CA, EE.UU.), consistente en dos cromatógrafos de gas independientes interconectados por una línea de transferencia termorregulada mantenida a 200 °C. En el primer cromatógrafo se han inyectado 40 µL de la muestra a estudiar, en las condiciones que se citan a continuación, y que son las mismas que aparecen publicadas en ^[11].

4.5.1. Primer cromatógrafo

El primer cromatógrafo es un modelo CP 3800 equipado con un inyector 1079 PTV (vaporizador de temperatura programable), detector FID y un puerto olfatómico (ODO-II de SGE, Rinwood, Australia), ambos de los cuales fueron conectados por un divisor de flujo a la salida de la columna para permitir detección en llama y olfatométrica simultánea del efluente de la primera columna.

Este cromatógrafo fue reacondicionado con una válvula Deans de conmutación accionada por presión (Valco Instruments, Houston, TX, EE.UU.), lo que hace posible transferir selectivamente cortes de eluyente desde la primera columna directamente a la columna colocada en el segundo cromatógrafo. El gas portador (He) fue suministrado a una presión constante de 30 psi. Durante los primeros dos min de cada medida, un flujo auxiliar de He se mantuvo a 15 psi y posteriormente fue elevado a 20 psi (válvula Deans).

La columna es una DB-WAX (polietilen glicol) de J&W (Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m x 0,32 mm de diámetro interno con un espesor de capa de 0,50 µm. Una columna de sílice fundida desactivada sin recubrimiento (30 m x 0,32 mm d.i.) de Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.) se utilizó como interfaz entre la válvula de conmutación Deans y los detectores FID y ODO. El programa de temperaturas del horno fue 40 °C durante 5 min, después se elevó 4 °C/min hasta alcanzar 100 °C, seguido de un aumento de 6 °C/min hasta alcanzar 220 °C, temperatura que se mantuvo durante 40 min. El detector FID se mantuvo a 300 °C.

4.5.2. Segundo cromatógrafo

El segundo cromatógrafo es un modelo CP 3800 acoplado a un detector de espectrometría de masas trampa de iones (Saturn 2200). El sistema estaba equipado con una unidad de críoatrapamiento de CO₂ y un puerto olfatómico (ODO-II de SGE) al final de la columna, de manera que es posible detección olfatométrica y escaneo MS simultáneas. Un flujo de compensación se desvió a través de un divisor de flujo colocado en el extremo de la columna y se colocó un limitador de flujo entre el divisor de flujo y el detector de MS.

La columna es un Factor Four VF-5MS (polimetilsiloxano - 5% difenilo) de Varian (30m x 0,32 mm d.i., espesor de capa de 1 mm). La columna se conectó directamente a la válvula

Deans colocada en el primer cromatógrafo a través de la línea de transferencia termostaticada. Los primeros centímetros de esta columna en el segundo GC cruzaron la unidad de criofocalizador (CO₂) y el extremo de la columna se unió a un divisor conectado a ambos detectores MS y ODO. Dos min después del corte, se eliminó el flujo de CO₂ al mismo tiempo que se activaba el programa de temperatura (4 °C/min hasta 200 °C y después 100 °C/min hasta 300 °C) del segundo horno. Los parámetros MS fueron: línea de transferencia a 170 °C; Trampa de iones a 150 °C; Y la corriente del emisor 30 µA. Durante todo el proceso de medida se utilizó el equipo en el modo de escaneo completo (rango de masas de 45-250 m/z).

Se ha recurrido a este sistema para localizar en la primera columna los compuestos dudosos según su IR polar y transferirlos selectivamente a la segunda columna y verificar la identidad de dichos compuestos en base a su IR apolar y su espectro de masas. Para ello se han inyectado 40 µL de extracto en las condiciones citadas anteriormente. Para el cálculo de los índices de retención lineales se inyectaron también 40 µL de alcanos en las mismas condiciones.

4.6. Tratamiento de datos

4.6.1. Estimación de índices de retención

Los tiempos de retención de nuestras zonas de olor tienen que ser normalizados y, para ello, se inyecta la mezcla de n-alcanos utilizados como patrones, la cual se puede obtener directamente de diferentes proveedores cromatográficos, exactamente en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo la medida olfatométrica GC-O.

Para el cálculo de los índices de retención de los aromas obtenidos, se hace uso de la siguiente fórmula ^[21]:

$$IR = 100 \times \left[\frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} + z \right]$$

Donde t_{Ri} es el tiempo de retención al que hemos detectado el aroma en cuestión, t_{Rz} y $t_{R(z+1)}$ son los tiempos de retención de los alcanos anterior y posterior al aroma detectado y z es el número de carbonos del alcano.

Estos índices de retención, al estar normalizados, pueden ser utilizados para localizar los compuestos de interés en espectros obtenidos en distintos equipos (GC-FID, GC-MS) siempre que se utilice el mismo tipo de columna.

4.6.2. Cálculo de frecuencias modificadas (FM%)

Con este criterio se quiere discernir aquellos compuestos aromáticos que pueden tener una cierta relevancia en el aroma del producto evaluado. En nuestro caso, una vez

calculados los índices de retención procedemos a calcular la frecuencia modificada de cada aroma utilizando la siguiente fórmula:

$$FM\% = \sqrt{F\% \times I\%}$$

Donde F% es el porcentaje de la frecuencia con la que se ha detectado ese aroma (si los 6 panelistas lo detectan, es del 100%) e I% es el porcentaje de intensidad detectado (si los 6 panelistas lo detectan con una intensidad igual a 3, es del 100%).

De esta manera, las zonas odorantes que reciben una puntuación inferior al 30 % se consideran ruido y, por lo tanto, no son tenidas en cuenta en el perfil aromático. Además, este parámetro nos sirve para jerarquizar los odorantes en función de su importancia aromática.

5. Resultados y discusión

En este apartado se trata de estudiar e interpretar los resultados obtenidos tras la realización de ambos métodos con el fin de evaluar el perfil aromático de los vinos escogidos y determinar la procedencia de las notas aromáticas detectadas.

Con respecto al procedimiento seguido, cabe destacar que, en ambos casos, se ha realizado de la siguiente manera:

En primer lugar, se ha obtenido el extracto representativo correspondiente a cada uno de los vinos, haciendo uso de la estrategia basada en DHS-SPE (apartado 4.3.1) previamente desarrollada y validada por el grupo de investigación LAEE ^[16]. Asimismo, y tal y como se ha comentado anteriormente se preparó una muestra “blanco” y se obtuvo su extracto, siguiendo la misma estrategia que con las muestras reales.

A continuación, cada uno de dichos extractos, (incluida la muestra blanco), ha sido evaluado olfatométricamente a través de un panel conformado por 6 personas del laboratorio con amplia experiencia en las olfatometrías y previamente entrenados (sniffers), dando lugar a una serie de datos que han sido proporcionados por cada panelista.

Cabe destacar que en la evaluación olfatometría realizada sobre la muestra “blanco” no se detectó ninguna zona odorante, por lo que se verificó que no existían problemas de contaminación.

5.1. Vino tinto

Comenzamos por el vino tinto con aroma fruta roja, láctico, en el cual se ha conseguido detectar un total de 79 zonas odorantes, de las cuales 15 han presentado una frecuencia modificada (FM %) igual o superior a 30, es decir, no son consideradas ruido y, por tanto, pueden tener su repercusión en el aroma global del vino de estudio.

En la Tabla 1 aparecen estas 15 zonas ordenadas según se eluyen en columna polar. Además, aparece información en cuanto a los tiempos a los que se ha detectado cada zona junto con su índice de retención (IR) en columna polar, los descriptores proporcionados por los panelistas y los datos de frecuencias modificadas (todo ello ya calculado según lo descrito en el apartado 4.6). Asimismo, se han añadido los datos correspondientes al índice de retención en columna apolar y si se ha conseguido identificar por su espectro de masas (*= identificado, n.i.=no identificado).

Tabla 1. Datos extraídos de las principales zonas odorantes del vino tinto (código V8)

Tiempo polar (min, s)	IR Polar	IR Apolar	Descriptor	Compuesto	FM %	MS
3,49	934	756	Dulce, fresa, frutal	Isobutirato de etilo	58	n.i.
4,49	974	593	Fresa-nata, mantequilla	Diacetilo	88	n.i.
6,37	1038	801	Frutal, dulce	Butirato de etilo	47	*
7,08	1054	849	Frutal, fresa, dulce	2-Metilbutirato de etilo	48	n.i.
7,18	1061	700	Mantequilla, láctico	2,3-Pentanodiona	38	*
7,40	1073	853	Anisado, frutal	3-Metilbutirato de etilo	62	*
12,50	1220	755	Queso, rancio	Alcohol isoamílico	90	*
13,38	1242	996	Anisado, frutal	Hexanoato de etilo	55	*
20,43	1445	1195	Cítrico	Octanoato de etilo	31	*
22,51	1514	1156	Piscina, cloro	Z-2-Nonenal	41	n.i.
25,39	1621	1270	Verde	Z-2-Decenal	30	n.i.
27,06	1685	834	Queso, levadura	Acido 3-Metilbutirico	80	*
28,07	1731	1159	Floral	Acetato de bencilo	31	n.i.
30,18	1836	1388	Manzana asada	β -Damascenona	37	n.i.
32,04	1928	1116	Rosas	β -Feniletanol	83	*

Por consiguiente, con ayuda de los datos recopilados en la tabla, se realizó una búsqueda exhaustiva consultando diferentes bases de datos, tanto externas como las propias del laboratorio. Para confirmar las identidades propuestas, según bases de datos consultadas, se intentó identificar por espectro de masas, y en todos los casos se inyectaron en las mismas condiciones los patrones químicos tentativos en un GC-MS. A continuación, se adjunta un ejemplo de compuesto identificado, butirato de etilo, que aparece en nuestra muestra con un valor de frecuencia modificada del 47%.

Figura 3. Cromatograma obtenido para el compuesto butirato de etilo

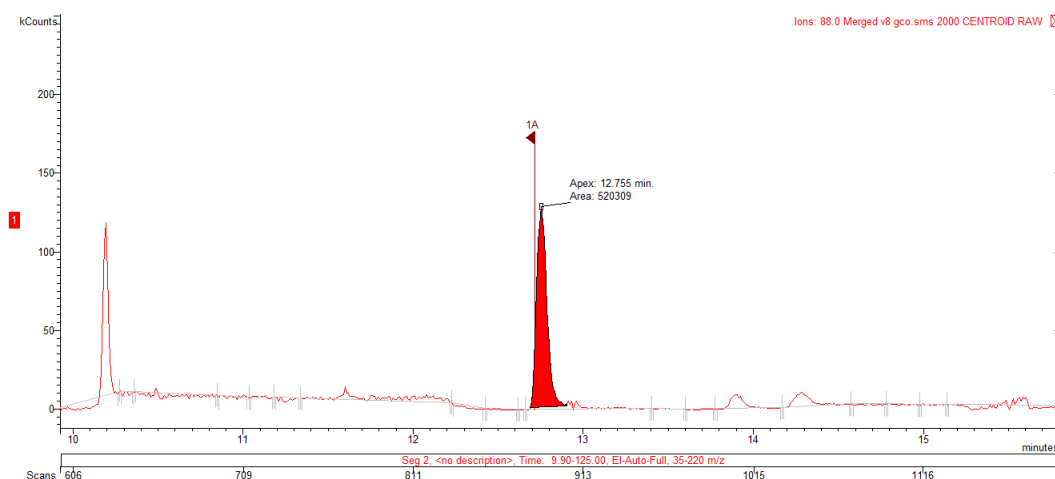


Figura 4. Espectro de masas obtenido para el compuesto butirato de etilo

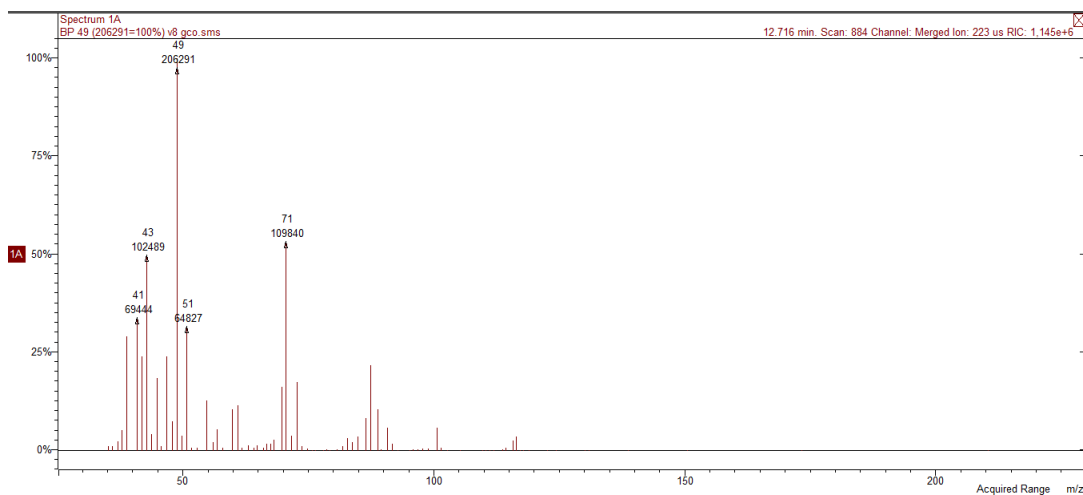
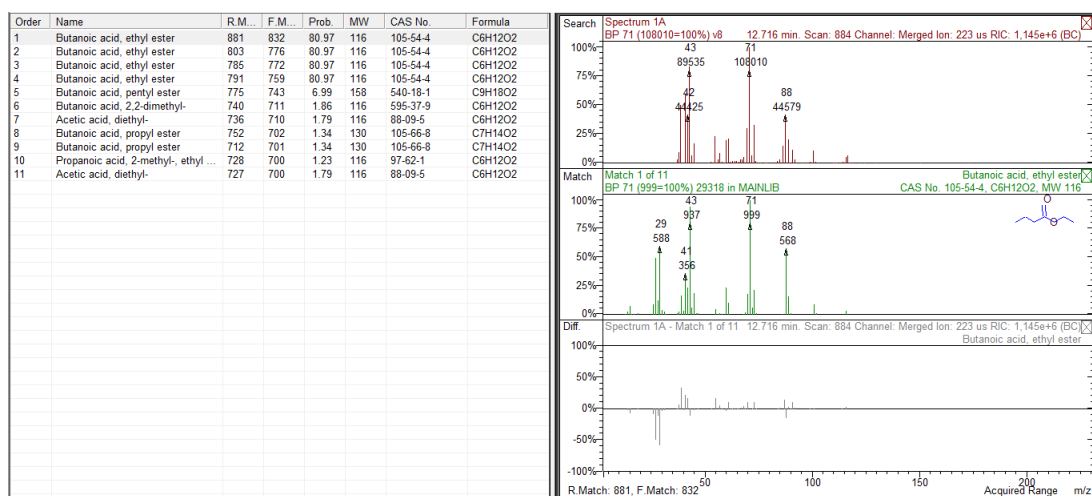


Figura 5. Búsqueda en librería del compuesto butirato de etilo



Para conseguir identificar los compuestos responsables de aquellas zonas de olor más difíciles, se ha recurrido al equipo GC-Multidimensional. De esta forma, basándonos en los índices de retención polares, se realizaron las capturas de los compuestos de interés, las cuales, posteriormente, se transfirieron al segundo cromatógrafo que conforma este equipo MDGC. Dicho cromatógrafo tiene instalada una columna apolar, lo cual nos permitió evaluar las capturas realizadas según el índice de retención apolar de los compuestos de interés y los espectros de masas obtenidos.

Siguiendo con la Tabla 1 en la penúltima columna se pueden contemplar los valores en relación a la frecuencia modificada (FM %) de los distintos compuestos. Se puede ver que destacan por sus altos valores de frecuencia modificada (FM %) los siguientes compuestos: alcohol isoamílico (90 %), diacetilo (88 %), β -feniletanol (83 %) y ácido 3-metilbutírico (80 %).

Atendiendo a la Figura 1 y a los descriptores aromáticos que aparecieron como más relevantes en esta muestra, los compuestos aromáticos que pueden ver involucrados en estas notas son los siguientes:

- En primer lugar, destaca el diacetilo (notas lácticas) por su alta frecuencia modificada (88%). Otro carbonilo, la 2,3-pentanediona, puede tener un papel clave en estas notas lácticas, ya que, a pesar de no haber recibido un alto valor de FM, es un compuesto que no suele detectarse olfatométricamente en todos los vinos. Por lo tanto, a ambos carbonilos se les puede responsabilizar de la intensa nota láctica de este vino.
- Le sigue la β -damascenona, la cual está muy relacionada con las notas fruta pasa/compota.
- Por último, los ésteres etílicos isobutirato de etilo, 2-metilbutirato de etilo y 3-metilbutirato de etilo imparten notas frutales, que actúan en combinación.

Por otro lado, como se puede observar en la última columna de la misma tabla, aparece un asterisco en aquellos casos en los que los datos no se han conseguido obtener a través de los espectros de masas. Para los casos del isobutirato de etilo y diacetilo, el motivo es que estos compuestos eluyen muy próximos al disolvente (diclorometano), lo que impide obtener un espectro de masas de los mismos. Por otro lado, los aldehídos (Z-2-nonenal, Z-2-decenal) son compuestos con muy pobres propiedades cromatográficas y espectrométricas, de ahí que su análisis casi siempre se haga previa derivatización con el fin de formar compuestos más pesados y con masas más grandes que ofrecen una mayor selectividad. Finalmente, compuestos como el acetato de bencilo y, en especial, la β -damascenona pueden encontrarse en niveles de concentración muy bajos ($\mu\text{g/L}$ o incluso $< 1 \mu\text{g/L}$), lo cual dificulta mucho localizarlos. En estos casos, de nuevo, se requieren metodologías más específicas que proporcionen la sensibilidad necesaria que nos permita alcanzar niveles trazas ($\mu\text{g/L}$, ng/L).

EL extracto usado para realizar la olfatometría se inyectó en el sistema GC-MS y se integraron las áreas de los odorantes detectados por GC-O, (ver Tabla 2).

Tabla 2. Datos semicuantitativos (GC-MS)

	Compuesto	m/z	tr (min)	Área	FM%
S.I.	Butirato de hexilo	43	35,56	1,21E+06	-
1	Butirato de etilo	71	12,75	1,59E+06	47
2	Alcohol isoamílico	RIC	23,013	2,57E+09	90
3	Hexanoato de etilo	88	23,878	2,12E+06	55
	Hexanoato de etilo	RIC	23,878	3,08E+07	55
4	Octanoato de etilo	88	37,188	3,98E+06	31
5	β -Feniletanol	91	63,745	2,86E+07	83
6	2,3-Pentanodiona	43	13,915	2,44E+06	38
7	3-Metilbutirato de etilo	88	14,289	5,55E+04	62
8	Acido 3-metilbutirico	60	50,546	5,26E+05	80

Para poder evaluar la contribución aromática de la familia de los compuestos que han resultado importantes en la GC-O de este vino, se han analizado los resultados cuantitativos obtenidos al aplicar los métodos desarrollados por el laboratorio tanto para compuestos presentes a nivel mayoritario como trazas [22, 23]. Para ello se ha tenido en cuenta el umbral de olfacción de cada compuesto y el nivel de concentración encontrado. Umbral de olfacción se define como la mínima concentración de compuesto que puede detectarse en una matriz determinada, en este caso en vino. Se considera que un compuesto puede tener cierta relevancia aromática cuando el cociente entre su concentración y su umbral es superior a la unidad. Este cociente recibe la denominación de valor de aroma (OAV).

Tal y como se puede ver en la siguiente tabla (Tabla 3). Si nos fijamos en la última columna (OAV), se observa que 4 compuestos presentan valores superiores a la unidad, alcanzando valores muy altos, como es el caso del ácido 3-metilbutirico (89) y diacetilo (14). En este punto, hay que tener en cuenta que la 2,3-pentanodiona no aparece en esta tabla porque no se cuantifica en los métodos de rutina del laboratorio.

Tabla 3. Niveles de concentración y valores de aroma (OAV) de algunos de los compuestos aromáticos implicados en el aroma del vino tinto con notas "lácticas, frutas rojas"

	Umbral olfacción mg/L	Concentración mg/L	OAV (C/Umbral)
Diacetilo	0,1	1,38	14,0
Ácido 3-metilbutirico	0,033	2,93	89,0
	μ g/L	μ g/L	
Isobutirato etilo	15	20,6	1,4
2-Metilbutirato de etilo	18	2,1	0,1
3-Metilbutirato de etilo	3	4,07	1,4

5.2. Vino blanco

Por otra parte, se encuentra el otro vino seleccionado, el vino blanco con aroma a pera. En este caso, se han detectado un total de 94 zonas odorantes, de las cuales 15 han presentado una FM% igual o superior a 30. Haciendo uso del criterio desarrollado anteriormente, del mismo modo, también son significativas al no representar menos del 30%.

Ahora, en la Tabla 4, se muestran estas 15 zonas dispuestas por orden de elución en columna polar. Hemos usado el mismo procedimiento descrito para la muestra V8.

Tabla 4. Datos extraídos de las principales zonas odorantes del vino blanco (código V45)

Tiempo polar (min, s)	IR Polar	IR Apolar	Descriptor aromático	Compuesto	FM%	MS
3,50	934	756	Dulce, frutal, fresa	Isobutirato de etilo	31	n.i.
4,55	979	593	Fresa-nata, mantequilla	Diacetilo	69	n.i.
6,35	1041	801	Frutal, dulce	Butirato de etilo	78	*
7,36	1075	853	Anisado, frutal	3-Metilbutirato de etilo	50	n.i.
9,30	1133	875	Plátano	Acetato de isoamilo	72	*
12,50	1224	755	Queso, rancio	Alcohol isoamílico	80	*
13,38	1248	996	Anisado, frutal	Hexanoato de etilo	79	*
16,05	1315	975	Champiñón	1-Octen-3-ona	31	n.i.
20,46	1450	1195	Cítrico	Octanoato de etilo	37	*
22,53	1521	1156	Piscina, cloro	Z-2-Nonenal	53	n.i.
27,07	1686	834	Queso, levadura	Acido 3-Metilbutirico	63	n.i.
28,49	1766		Jabonoso, terroso	n.i.	32	n.i.
30,12	1832	1254	Rosas, miel, floral	Acetato de 2-feniletilo	47	*
30,20	1839	1388	Manzana asada	β -Damascenona	35	n.i.
32,06	1930	1116	Rosas	β -Feniletanol	53	*

Se puede notar que, de las 15 zonas odorantes, 14 se han podido atribuir satisfactoriamente a la presencia de una molécula odorante. Los compuestos que se han percibido con una mayor intensidad en esta muestra han sido el alcohol isoamílico con un porcentaje elevado del 80%, seguido del hexanoato de etilo con una cifra del 79% y del butirato de etilo con un valor del 78% y, por último, se encuentra el acetato de isoamilo (72%).

A la hora de intentar explicar el característico aroma a pera encontrado en esta muestra de vino, y tal y como se observa en esta tabla, no se ha encontrado ningún compuesto que por sí solo imparta el aroma a pera. Esta era una de las hipótesis de partida, ya que se sabe de la existencia de una molécula que imparte aroma a pera. Se trata del 2,4-decadieonato^[24-27]. Sin embargo, este compuesto no aparece en el perfil aromático, por lo tanto, se descarta su participación.

La hipótesis que sí que se ha verificado es aquella basada en que el aroma a pera se debe a la acción conjunta de aromas frutales, proporcionados por esteres de fermentación como son el butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo junto con aromas dulzones proporcionados por los acetatos de alcoholes superiores como son acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletilo. Todos estos esteres etílicos como acetatos aparecen en el perfil aromático de esta muestra de vino con valores de frecuencias modificadas altas en la mayoría de los casos. De esta manera, el butirato y el hexanoato de etilo han recibido una FM % de 78 y 79 respectivamente y el acetato de isoamilo y el acetato de 2-feniletilo un 72 % y 47 % respectivamente.

En la Tabla 5 se muestran las integraciones de los picos cromatográficos obtenidos al inyectar el extracto usado para olfatometría en un GC-MS.

Tabla 5. *Datos semicuantitativos (GC-MS).*

	Compuesto	m/z	tr (min)	Área	FM%
S.I.	Butirato de hexilo	43	35,96	1,10E+06	-
1	Butirato de etilo	71	13,53	8,34E+06	78
2	Acetato de isoamilo	43	17,734	2,28E+06	72
3	Alcohol isoamílico	RIC	23,039	1,55E+09	80
4	Hexanoato de etilo	88	24,039	5,24E+06	79
	Hexanoato de etilo	RIC	24,117	1,40E+08	79
5	Octanoato de etilo	88	36,979	1,13E+07	37
6	Acetato de 2-feniletilo	104	58,807	1,15E+07	47
7	β-Feniletanol	91	63,789	1,15E+07	53

Se puede observar que se ha conseguido integrar el área de los cinco compuestos aromáticos que participan en las notas aromáticas pera y fruta tropical. En el caso de los esteres de fermentación, hemos integrado el pico con m/z 71 del butirato de etilo, hallando así, un área de 8,34E+06 que se corresponde con un valor de frecuencia modificada de 78, el pico m/z 88 además del pico observado en el espectro completo (RIC) correspondientes al hexanoato de etilo que nos han proporcionado áreas de 5,24E+06 y 1,40E+08 respectivamente, relacionadas con el alto valor de frecuencia modificada obtenido en este caso (FM%=79) y el pico m/z 88 del octanoato de etilo que ha proporcionado un área de 1,13E+07 con un valor de frecuencia modificada de 37, lo que nos indica que este compuesto interacciona débilmente con los receptores olfativos, de esta forma a pesar de hallarse en una alta concentración se percibe en menor proporción en las olfatometrías.

En la siguiente tabla (Tabla 6) podemos observar la relación existente entre las áreas de integración de los picos y las frecuencias modificadas, en compuestos detectados en ambas muestras. En la primera línea se muestra la integración del pico correspondiente al butirato de hexilo, empleado como estándar interno. Se observa que el área obtenida en los dos extractos es similar, lo cual nos permite comparar el resto de compuestos.

Tabla 6. Comparativa entre los compuestos de interés aromático en ambas muestras

Compuesto	m/z	V8			V45		
		tr (min)	Área	FM%	tr (min)	Área	FM%
S.I. Butirato de hexilo	43	35,6	1,21E+06	-	35,6	1,10E+06	-
1 Butirato de etilo	71	12,7	1,59E+06	47	12,7	8,34E+06	78
2 Alcohol isoamílico	RIC	23,0	2,57E+09	90	23,0	1,55E+09	80
3 Hexanoato de etilo	88	23,9	2,12E+06	55	23,9	5,24E+06	79
Hexanoato de etilo	RIC	23,9	3,08E+07	55	23,9	1,40E+08	79
4 Octanoato de etilo	88	37,2	3,98E+06	31	37,2	1,13E+07	37
5 β-Feniletanol	91	63,7	2,86E+07	83	63,7	1,15E+07	53

Se aprecia una clara correlación entre las áreas integradas (datos semicuantitativos) y las frecuencias modificadas (datos olfatométricos). Si nos fijamos en el caso del butirato de etilo se observa que para la muestra V8 tiene un área integrada de 1,59E+06 con una FM% de 47, mientras que para la muestra V45 tiene un área integrada de 8,34E+06 con una FM% de 78. Podemos afirmar que este aumento de la concentración en la muestra V45 nos proporciona un valor de frecuencia modificada mayor en dicha muestra para el butirato de etilo, detectándose así más intensamente. Esta relación se observa también en el resto de compuestos detectados en ambas muestras.

Para poder evaluar la contribución aromática de la familia de los acetatos y ésteres etílicos en el aroma de este vino, se han analizado los resultados cuantitativos obtenidos al aplicar los métodos desarrollados por el laboratorio tanto para compuestos presentes a nivel mayoritario como traza ^[22, 23]. Para ello se ha tenido en cuenta el umbral de olfacción de cada compuesto y el nivel de concentración encontrado.

Tal y como se puede ver en la siguiente tabla (Tabla 7), los 5 odorantes presentan umbrales de olfacción que difieren mucho, y que van comprendidos entre 0,03 mg/L (30 µg/L) para el acetato de isoamilo hasta 250 µg/L para el acetato de 2-feniletilo. Si nos fijamos en la última columna (OAV), se observa que los 5 compuestos presentan valores superiores a la unidad, alcanzando valores muy altos, como es el caso del acetato de isoamilo (145) y hexanoato de etilo (26,1). Por lo tanto, estos 5 acetatos y ésteres son los que mayor importancia tendrán a nivel aromático en la nota para del vino de partida.

Tabla 7. Niveles de concentración y valores de aroma (OAV) de algunos de los compuestos aromáticos implicados en el aroma del vino blanco con notas “pera”

	Umbral olfacción	Concentración	OAV (C/Umbral)
	µg/L	µg/L	
Acetato de 2-feniletilo	250	404	1,6
	mg/L	mg/L	
Acetato de isoamilo	0,03	4,34	145,0
Butirato de etilo	0,125	0,31	2,5
Hexanoato de etilo	0,062	1,62	26,1
Octanoato de etilo	0,58	1,33	2,3

6. Conclusiones

Tras la evaluación olfatométrica llevada a cabo para estos dos vinos por un panel de seis jueces se extraen las siguientes conclusiones:

- El aroma “cereza, fruta roja” del primero de los vinos no ha podido explicarse por la presencia de un único compuesto, sino que ha sido atribuido a la acción conjunta de compuestos de fermentación como el diacetilo y la 2,3-pentanodiona y a ésteres etílicos (isobutirato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, 3-metilbutirato de etilo). De todos ellos destacan los dos primeros por su característico aroma “láctico, nata-fresa”. El diacetilo se ha detectado con una alta intensidad (88 % FM). La 2,3-pentanodiona, por su parte, a pesar de detectarse con una intensidad menor (38% FM), es relevante, ya que este compuesto no es habitual encontrarlo en el perfil aromático de los vinos tintos.
- El aroma “pera” característico del segundo de los vinos no ha podido atribuirse a un único compuesto, sino que se explica por la acción conjunta de al menos dos olores simples (los aromas frutales tipo manzana y olores dulzones, amielados o florales). Los primeros son típicos de los ésteres de fermentación (butirato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo), mientras que los aromas dulzones son propios de los acetatos de alcoholes superiores (acetato de isoamilo, acetato de 2-feniletilo).

Como conclusión final resaltar que se ha conseguido caracterizar desde el punto de vista olfatométrico los dos vinos preseleccionados, identificándose prácticamente todos los compuestos aromáticos más relevantes en ambos casos. Así mismo, se concluye que en ninguno de los dos vinos se ha encontrado una única molécula a la que pueda atribuirse el aroma buscado. Sin embargo, sí que se han identificado varios odorantes, cuya acción conjunta puede explicar estos aromas objeto de estudio. La relevancia de estos conjuntos de odorantes en los aromas de interés se ha verificado a través de la determinación cuantitativa de los mismos, obteniéndose niveles importantes en todos ellos.

7. Bibliografía

1. Ferreira, V. and J. Cacho, *Identificaton of impact odorants of wines*, in *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, Editor. 2009. p. 393-415.
2. Aznar, M., et al., *Prediction of aged red wine aroma properties from aroma chemical composition. Partial least squares regression models*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(9): p. 2700-2707.
3. Campo, E., et al., *Aroma properties of young Spanish monovarietal white wines: a study using sorting task, list of terms and frequency of citation*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2008. **14**(2): p. 104-115.
4. San-Juan, F., et al., *Quality and Aromatic Sensory Descriptors (Mainly Fresh and Dry Fruit Character) of Spanish Red Wines can be Predicted from their Aroma-Active Chemical Composition*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(14): p. 7916-7924.
5. d'Acampora Zellner, B., et al., *Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis*. Journal of chromatography. A, 2008. **1186**(1-2): p. 123-43.
6. Wardencki, W., et al., *APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY AND OLFACTOMETRY FOR QUALITY ASSESSMENT OF SELECTED FOOD PRODUCTS*. Ecological Chemistry and Engineering S-Chemia I Inzynieria Ekologiczna S, 2009. **16**(3): p. 287-300.
7. Filipe-Ribeiro, L., et al., *Reduction fo 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine by activated carbons with different physicochemical characteristics: Impact on wine quality*. Food chemistry, 2017. **229**: p. 242-251.
8. Liato, v. and M. Aider, *Geosmin as a source of the earthy-musty smell in fruits, vegetables and water: Origins, impact on foods and water, and review of the removing techniques*. Chemosphere, 2017. **181**: p. 9-18.
9. Strangl, M., et al., *Characterization of odorous contaminats in post-consumer plastic packaging waste using multidimensional gas chromatographic separation coupled with olfactometric resolution*. Journal of Separation Science, 2017. **40**: p. 1500-1507.
10. Campo, E., et al., *Identification of three novel compounds in wine by means of a laboratory-constructed multidimensional gas chromatographic system*. Journal of Chromatography A, 2006. **1122**(1-2): p. 202-208.
11. Cullere, L., et al., *2-Methyl-3-(methyldithio)furan: A new odorant identified in different monovarietal red wines from the Canary Islands and aromatic profile of these wines*. Journal of Food Composition and Analysis, 2008. **21**(8): p. 708-715.
12. Pons, A., et al., *Identification and analysis of piperitone in red wines*. Food Chemistry, 2016. **206**: p. 191-196.
13. Kroener, E.M. and A. Buettner, *Unravelling important odorants in horseradish (Armoracia rusticana)*. Food Chemsitry 2017. **232**: p. 455-465.
14. Guillot, S., et al., *Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry*. Food Chemistry, 2006. **96**(1): p. 147-155.
15. Marco, A., J.L. Navarro, and M. Flores, *Quantitation of selected odor-active constituents in dry fermented sausages prepared with different curing salts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(8): p. 3058-3065.
16. Escudero, A., et al., *Is orthonasal olfaction an equilibrium driven process? Design and validation of a dynamic purge and trap system for the study of orthonasal wine aroma*. Flavour and Fragrance Journal, 2014. **29**(5): p. 296-304.

17. San-Juan, F., et al., *Producing headspace extracts for the gas chromatography-olfactometric evaluation of wine aroma*. Food Chemistry, 2010. **123**: p. 188-195.
18. Barata, A., et al., *Analytical and Sensorial Characterization of the Aroma of Wines Produced with Sour Rotten Grapes Using GC-O and GC-MS: Identification of Key Aroma Compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(6): p. 2543-2553.
19. Cullere, L., et al., *Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(6): p. 1653-1660.
20. Cacho, J., et al., *Characterization of the aromatic profile of the Italia variety of Peruvian pisco by gas chromatography-olfactometry and gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometry detection systems*. Food Research International, 2012. **49**: p. 117-125.
21. Dravnieks, A., *Atlas of odor character profiles*; A. Ed., Editor. 1985: Philadelphia, PA. p. 354.
22. Lopez, R., et al., *Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A, 2002. **966**(1-2): p. 167-177.
23. Ortega, C., et al., *Fast analysis of important wine volatile compounds Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts*. Journal of Chromatography A, 2001. **923**(1-2): p. 205-214.
24. Diban, N., et al., *Granular activated carbon for the recovery of the main pear aroma compound: Viability and kinetic modelling of ethyl-2,4-decadienoate adsorption*. Journal of Food Engineering, 2007. **78**(4): p. 1259-1266.
25. Qin, G.H., et al., *Evolution of the Aroma Volatiles of Pear Fruits Supplemented with Fatty Acid Metabolic Precursors*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 20183-20196.
26. Tian, H.L., et al., *Development of a flavour fingerprint by GC-MS and GC-O combined with chemometric methods for the quality control of Korla pear (Pyrus serotina Reld)*. International Journal of Food Science and Technology, 2014. **49**(12): p. 2546-2552.
27. Willner, B., M. Granvogl, and P. Schieberle, *Characterization of the Key Aroma Compounds in Bartlett Pear Brandies by Means of the Sensomics Concept*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(40): p. 9583-9593.