



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Caracterización química del aroma de muestras
diferentes sensorialmente

Chemical characterization of the aroma of sensory
different samples

Autor

Clara Abardía Serrano

Director

Ana Escudero Carra

Facultad de Ciencias
2017-2018

*Para el LAE, especialmente a Nachiño,
Moitas grazas por axudarme e coidar de
min. “Es máis listo que un allo”*

RESUMEN

Resumen

El presente trabajo Fin de Grado se centra en el conocimiento de la base química del aroma de algunos vinos tintos aragoneses diferentes sensorialmente.

Como método principal y semi-cuantitativo para jerarquizar los componentes del aroma, se ha utilizado la cromatografía de gases-olfatometría (CG-O). Las cuatro muestras han sido previamente procesadas para obtener el extracto con los compuestos aromáticos correspondientes mediante espacio de cabeza dinámico con extracción en fase sólida (DHS-SPE). Ese extracto representativo del aroma del vino se ha inyectado en varios cromatógrafos.

Una vez obtenido el perfil olfatométrico, se analizó el extracto mediante cromatografía de gases-espectrometría de Masas (GC-MS), para de forma complementaria con GC-O, identificar y cuantificar los compuestos activos aromáticamente.

Entre los compuestos responsables de los aromas diferenciadores entre los vinos han sido el acetal, la 2,3-pentanediona, la Z-1,5-octadien-3-ona y algunos ésteres como el hexanoato de etilo.

Abstract

This present end-of-degree project is aimed at analyzing the chemical base of the aroma in some red and sensory different wines from Aragon.

As a principal and semi-quantitative method to organize aroma components hierarchically, the chromatography in gas-olfactometry (CG-O) has been used. Four samples have been previously processed to obtain the extract with the corresponding aromatic compounds by means of dynamic head space with extraction in solid phase (DHS-SPE). That representative extract from the aroma of the wine has been injected in some chromatographs.

Once the olfactometric profile was obtained, the extract was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), so as to be complementary with GC-O, and therefore, to identify and quantify the aromatically active compounds.

Among the compounds responsible for the differentiating aromas between wines we have acetal, 2,3-pentanedione, Z-1,5-octadien-3-one and some esters such as ethyl hexanoate.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1 Aroma del vino.....	1
1.2 Importancia de la olfatometría.....	2
2. Objetivos.....	3
3. Materiales y métodos.....	5
3.1 Muestras.....	5
3.2 Reactivos y materiales.....	6
3.3 Obtención de extractos.....	6
3.4 Análisis GC-FID-Olfatometría.....	7
3.5 Análisis GC-MS.....	10
3.6 Tratamiento de datos.....	10
4. Resultados y discusión.....	11
4.1 Control del sistema cromatográfico.....	11
4.2 Diferencias entre sistemas cromatográficos.....	13
4.3 Cromatografía de gases-olfatometría, GC-O.....	16
4.4 Cromatografía de gases-masas, GC-MS.....	19
5. Conclusiones.....	22
6. Bibliografía.....	23

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aroma del vino

El aroma del vino es muy complejo sensorial y químicamente, y su determinación se enfrenta a una serie de dificultades además de las que el propio análisis conlleva. Tal complejidad sensorial se debe a la diversidad química del mismo, tanto en número de compuestos como en variabilidad de las concentraciones de los mismos.

Los vinos, en su mayoría, no presentan compuestos aromáticos de impacto, es decir, un compuesto concreto que describa el aroma del vino, sino un número relativamente grande de odorantes activos que contribuyen en mayor o menor medida a los diferentes matices del aroma.^[1-3]

El vino contiene miles de moléculas diferentes, y un gran número de ellas son volátiles. Muchas de estas moléculas volátiles pueden tener propiedades sensoriales, pero sólo un número limitado 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 tendrán que ser analizados y considerados más a fondo en los estudios del aroma.

El número y concentración de los componentes varía ampliamente. Algunos compuestos aparecen en niveles de g/L, sin embargo, una gran parte aparece a niveles significativamente más bajos como son ng/L^[1]. La influencia de los compuestos individuales en el perfil sensorial puede ser muy diferente.

Las diferentes familias de compuestos químicos que están presentes simultáneamente con aromas diversos, hacen que la percepción final sea el resultado de la interacción de los aromas formando así una percepción diferente¹. Las familias químicas presentes pueden ser alcoholes, ácidos, ésteres, aldehídos, terpenos, cetonas, fenoles, etc.

Puesto que todos los compuestos responsables del aroma deben ser volátiles, la técnica más adecuada para separar las moléculas activas del olor, del resto de moléculas es la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O)^[1]. Esta técnica hace uso de la nariz humana como detector para los compuestos que se eluyen de la columna cromatográfica.

1.2 Importancia de la olfatometría

La capacidad de percibir olores siempre se ha empleado como herramienta de identificación, es decir, de análisis cualitativo de componentes aromáticos. Hoy en día, se sigue considerando información auxiliar de la proporcionada por los métodos instrumentales de análisis cuantitativo.

En los años anteriores a los 80, los investigadores se encontraron serios problemas para identificar los odorantes realmente importantes en el vino y se dedicaron con afán al aislamiento e identificación de compuestos que, realmente no eran relevantes. Sin embargo, la aplicación de distintas técnicas olfatométricas desde finales de los ochenta ha tenido un gran impacto en los rendimientos obtenidos por los investigadores y en los últimos años la mayoría de los odorantes más activos en un vino han podido ser identificados.^[4]

La olfacción es un sentido sometido a fuentes de variabilidad difíciles de controlar, por lo que la medida de los olores es, en principio, más imprecisa e inexacta que una determinación instrumental. Pero el desarrollo creciente del análisis sensorial⁽¹⁾ demuestra que, trabajando en unas condiciones definidas, se puede obtener una información de alta calidad analítica. En este sentido, recientes contribuciones científicas han demostrado que es posible obtener resultados cuantitativos satisfactorios empleando estrategias basadas en la medición de la frecuencia de detección, o de la intensidad de un odorante eluído en un sistema GC por un panel de catadores.^[5,6]

El primer paso para el análisis cromatográfico del aroma del vino es la obtención de un extracto que refleje la composición de la atmósfera en equilibrio con el vino, tanto en número de componentes como en sus concentraciones. Buscamos que dicho extracto sea representativo del aroma que se percibe en los correspondientes vinos.

La técnica mediante la cual se obtuvo el extracto en este trabajo se basa en espacio de cabeza dinámico (DHS-SPE). Consiste en la purga de la muestra con un gas inerte, simulando las condiciones que se dan en la boca durante la ingestión del producto. Conforme se van desprendiendo los volátiles de la matriz, la corriente de flujo de gas los conduce hasta al cartucho que está acoplado al espacio de cabeza. El cartucho de extracción en fase sólida (SPE) contiene un sorbente, una resina polimérica, en el cual se quedan retenidos los volátiles.^[7,8]

¹ El análisis sensorial se define como *la cuantificación de la respuesta humana a estímulos percibidos por sentidos como la vista, olfato, gusto, tacto y oído.*^[15]

Las resinas LiChrolut EN son utilizadas por tener una alta superficie específica. Con pequeña cantidad de sorbente retienen muchos compuestos volátiles. Esto nos proporciona la ventaja de necesitar muy poco volumen de disolvente para la posterior elución de los compuestos del aroma, reduciendo así, la etapa de evaporación para conseguir la preconcentración necesaria para llegar a la sensibilidad requerida. La extracción en fase sólida presenta ventajas frente a la extracción líquido-líquido, como evitar la formación de emulsiones.^[4] El uso de estas resinas se ha extendido en nuestro laboratorio ^[9,10] ya que se obtienen extractos muy representativos de las muestras a caracterizar.

Respecto a un aspecto tan importante como es la representatividad olfativa, la naturaleza del extracto mismo es uno de los factores más importantes que condiciona la fiabilidad de los resultados del análisis olfatométrico.^[11] La representatividad es necesaria si se quieren evaluar de forma fiable las sustancias clave del aroma de un alimento, para evidenciar las sustancias que diferencian aromas entre muestras. Desde el enfoque olfatométrico, un extracto representativo es el que contiene los compuestos capaces de alcanzar los receptores olfativos en proporciones similares a las que se encuentran en las fosas nasal durante el consumo.

Para llegar a la optimización de esta técnica se tuvo que realizar un gran trabajo experimental comparando diferentes extractos con diferentes condiciones.^[12] La técnica-procedimiento GC-O utilizada en el presente trabajo ha sido desarrollada y validada por nuestro grupo de investigación.^[13]

La cromatografía de gases-olfatometría es el método analítico más apropiado para la determinación de los constituyentes individuales al aroma total de un producto. Al poseer dos detectores simultáneos portal olfativo y FID, se puede correlacionar señal sensorial de interés con los posibles picos cromatográficos. Es decir, al análisis instrumental habitual se le añade un análisis sensorial.^[14,15]

El procedimiento para conocer los compuestos responsables de las zonas olfativas son:

- Coincidencia de los índices de retención de mi zona en dos columnas de diferentes polaridades, según bases de datos (listas de índices de retención de compuestos químicos en columnas de diferente polaridad).
- Similitud del olor del compuesto puro con índice de retención similar con las descripciones de la zona odorante.
- Obtención del espectro de masas en esa zona cuando se inyecta en cromatografía gases-espectrometría de masas (GC-MS) y similitud a espectros de masas presentes en librerías.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal es la aplicación de los conocimientos y habilidades adquiridas a lo largo del grado en un problema real en el laboratorio, como es la caracterización de la base molecular del aroma de muestras diferentes sensorialmente.

El objetivo específico, es jerarquizar y conocer los compuestos químicos responsables de los aromas percibidos en cuatro vinos tintos diferentes mediante cromatografía de gases- olfatometría.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras

Las muestras eran vinos tintos procedentes de uvas de la variedad Moristel. El motivo de la elección es la diferenciación sensorial que se obtiene entre vinos procedentes de uvas de diferentes viñas, clasificadas como alto o bajo potencial. Los cuatro vinos analizados provienen de una experiencia con Bodegas Pirineos, trabajando con 2 viñas diferentes y 4 estados de maduración de las uvas (4x2=8 vinos en la experiencia total).

Las muestras han sido previamente evaluadas sensorialmente. Dicha evaluación RATA (Rate-all-that-apply) se realiza con un panel de 17 personas y las 8 muestras. Se presentaron 20 mL de cada muestra en copas negras, etiquetadas con códigos de 3 dígitos y organizadas de forma aleatoria para cada participante. A los jueces se les pidió evaluación orthonasal y que probaran las muestras e hicieran lo mismo para las sensaciones en boca. Los resultados se analizaron con un test ANOVA de factores, tras comprobar la reproducibilidad de los jueces y si el panel era consistente. Se elaboró un PCA (figura 1) para los atributos en los que aparecieron diferencias significativas, tanto en nariz como en boca. Resultaron relevantes las muestras: **BLOQUEADA**, por su matiz de reducción, **AP_N**, de alto potencial por sus notas de oxidación, **BP_FF** de bajo potencial, más vegetal Y **AP_FM** de alto potencial, con notas alcohólicas.

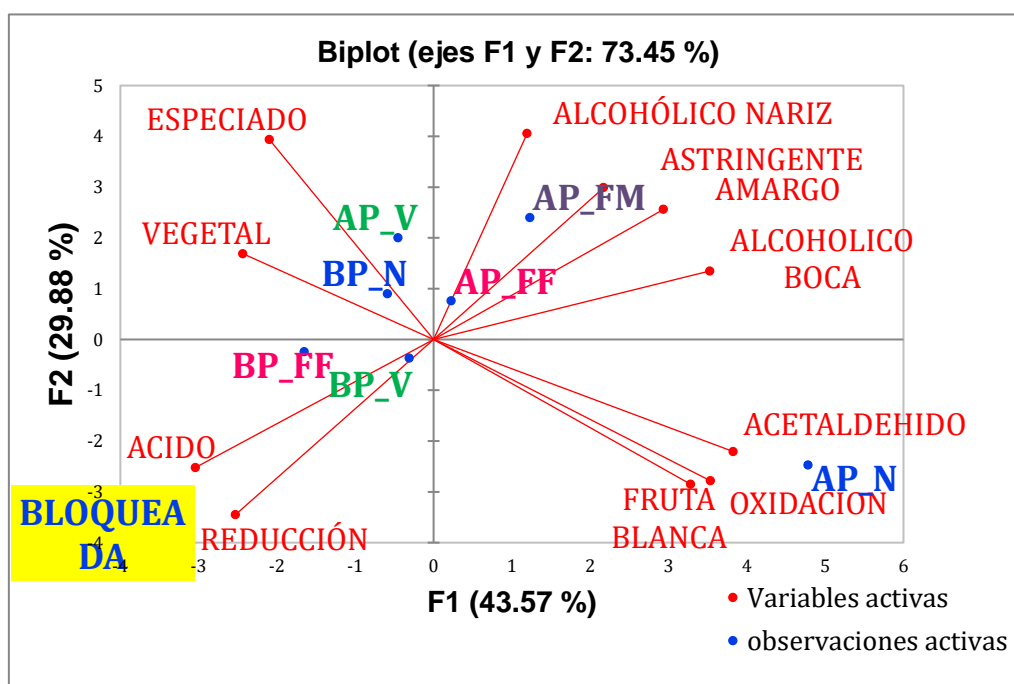


Figura 1. PCA, análisis de los atributos principales de las muestras a estudiar

3.2 Reactivos y materiales

Los reactivos que han sido empleados en el desarrollo de este trabajo son:

- Cartuchos de 3mL Bond Elut Reservoir, Agilent
- Frits de polietileno para cartuchos de 3mL
- Resinas LiChrolut EN, Merck
- Diclorometano (Fisher Scientific, UK)
- Metanol (Fisher Scientific, UK)
- Butirato de hexilo, (Sigma Aldrich, Merck) utilizado como patrón interno
- N-Alcanos, mezcla de alcanos C7-C30, disolución de 1000 µg/mL disueltos en hexano.
- Etanol LiChrosolv
- Agua MilliQ

3.3 Obtención de extractos

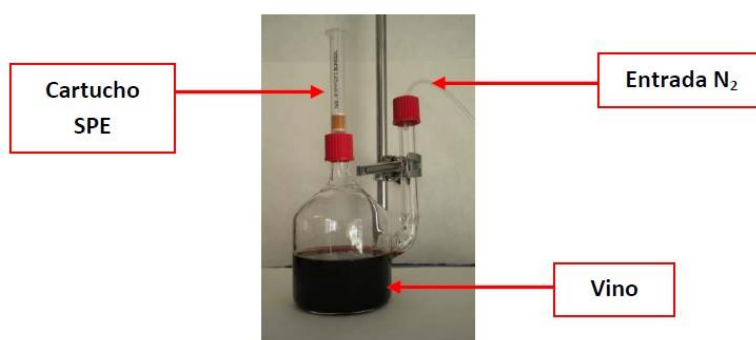


Figura 2. Dispositivo para la extracción (espacio de cabeza dinámico)

En primer lugar, se prepara el cartucho de polipropileno (SPE) cuyas dimensiones son 0,8 cm de diámetro y capacidad de 3 mL. Tras colocar en el interior un frit, se añaden 400 mg de resina LiChrolut EN. ^[16]

El cartucho se lava con 20 mL de diclorometano y se deja secar a vacío. Una vez se observa que la resina está completamente seca, se coloca en la salida correspondiente del recipiente de vidrio, donde se encuentran los 80 mL de vino (ver figura 2). Las condiciones de la extracción (espacio de cabeza dinámico) son temperatura ambiente y una corriente de nitrógeno con un flujo controlado de 500 mL/min durante 100 minutos.

Pasado ese tiempo, se retira el cartucho y para secarlo se somete a una corriente de nitrógeno durante otros 10 minutos para eliminar la posible presencia de agua. Una vez seco, el cartucho se eluye con 3,2 mL de una disolución de diclorometano/metanol al 5%, recogiendo dicho extracto en un vial. Posteriormente se añaden al extracto 40 µL de disolución de estándar interno (butirato de hexilo, 30 mg/L en diclorometano).

Para la concentración del extracto hasta 200 µL, se traspasa el volumen del vial a un Kuderna-Danish^[9] y se aplica de nuevo una leve corriente de nitrógeno, controlando cada 5 minutos con una pipeta Pasteur la homogeneidad en el extracto. Finalmente se conserva el extracto en congelador hasta su inyección en el cromatógrafo.

3.4 Análisis GC-FID-Olfatometría

Fueron utilizados dos cromatógrafos de gases, provistos cada uno de ellos de columnas de distinta polaridad.

Cromatógrafo I. Cromatógrafo GC Trace de ThermoQuest provisto con un detector de ionización de llama (FID) y una salida sniffing (ODO-1 de SGE) conectada al final de la columna mediante un divisor de flujo. La columna fue una columna polar DB-WAX (polietilenglicol) de J&W (Folsom, CA, USA), de 30 m de longitud x 0.32 mm de diámetro interno y 0.5 µm de espesor de fase, precedida por una precolumna desactivada de sílica fundida de 3 m x 0.32 mm. El gas portador fue hidrógeno, H₂, a un flujo de 3 mL min⁻¹.^[17] Se inyectó 1 µL del extracto concentrado en modo splitless, con un tiempo de splitless de 1 minuto.

El inyector y el detector FID se mantuvieron a 250 °C durante todo el programa. Para el horno, el programa de temperaturas fue el siguiente, los primeros 5 minutos se mantuvo a una temperatura de 40 °C, después se incrementó hasta 100 °C con una rampa de 4 °C min⁻¹ y finalmente hasta 200 °C con una rampa de 6 °C min⁻¹. El equipo estaba provisto de una resistencia que calentaba gradualmente el puerto de olfatometría para evitar la condensación de los volátiles. El software del cromatógrafo era Chrom-Card de Thermo Electron, versión 2.3.

Cromatógrafo II. Cromatógrafo GC8000 series (Fisons instruments) equipado de un detector de ionización de llama (FID) y un puerto de sniffing (ODO-1 de SGE) conectado mediante un divisor de flujo a la salida de la columna. La columna fue una columna apolar DB-5 (polimetilsiloxano – 5% difenilo) de J&W de 30 m de longitud x 0.32 mm de diámetro interno y 0.5 µm de espesor de fase, precedida por una precolumna desactivada de sílica fundida, 3 m x 0.32 mm. El gas portador fue H₂ a un

flujo de 3 mL min⁻¹. Se inyectó 1 µL del extracto concentrado en modo splitless, con un tiempo de splitless de 1 minuto.

El inyector y el detector FID se mantuvieron a 250 °C durante todo el programa. Para el horno, el programa de temperaturas fue el siguiente, los primeros 3 minutos se mantuvo a 40 °C, con una rampa de 4°C min⁻¹ hasta 100 °C, hasta 220 °C con una rampa de 6 °C min⁻¹ y posteriormente hasta 268 °C con una rampa de 15 °C min⁻¹. El cromatógrafo estaba provisto de una resistencia que calentaba gradualmente el puerto de olfatometría para evitar la condensación de los volátiles. El software del equipo era Chrom-Card de Thermo Electron, versión 2.3.

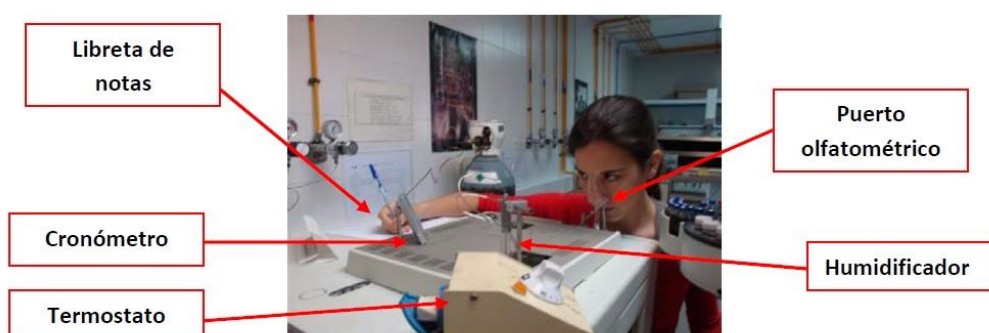


Figura 3. Cromatógrafo de gases-olfatometría, CG-O

El puerto olfatométrico (figura 3), o puerto de sniffing, se conecta con un tubo de sílice fundida hueco (línea de transferencia), al igual que el FID, a la bifurcación final de la columna. Los compuestos llegan al exterior del cromatógrafo donde se sitúa un vidrio con forma de nariz. La salida olfatométrica se calienta con un termostato para evitar la condensación de los analitos menos volátiles. También se añade un gas auxiliar (aire húmedo) al flujo de la columna que llega al puerto olfatométrico para evitar el secado de las fosas nasales de los sniffers.

En lo que respecta al panel, estaba compuesto por seis jueces o sniffers, los cuales evaluaron la intensidad de los odorantes a la salida de la columna cromatográfica. De los cuales, 5 tenían amplia experiencia en análisis olfatométrico mientras que el juez restante siguió un periodo de entrenamiento según el protocolo descrito en bibliografía.^[5] Se utilizó una escala de intensidad de 0-3 (0 = no detectado, 1 = débil, olor fácilmente reconocible, 2 = olor claro pero no intenso, 3 = olor claro e intenso) siendo las puntuaciones medias permitidas. Se anotaba también el tiempo al que se percibía el olor y una descripción del mismo. El programa duraba en torno a 40 minutos, cada cromatograma se dividía en dos partes olfatométricas de unos 20 minutos, y cada juez realizaba una sesión olfatométrica por día para no saturarse.^[13]

Otros aspectos a tener cuenta son las condiciones externas al análisis. En este caso, el detector principal es la nariz de los jueces, por lo que el entorno en el que se encuentra el equipo debe estar libre de ruidos y sobre todo de olores, además de que el laboratorio se encuentre a una temperatura constante. Minimizando así la influencia de factores externos en la técnica de análisis.

Para el posterior cálculo de los índices de retención, se inyectó en el mismo programa cromatográfico que los extractos, una disolución de una mezcla de alcanos. Los índices de retención lineales (IR) de las zonas olfativas se calculan teniendo en cuenta los tiempos de retención de los picos cromatográficos de los alcanos, su número de carbonos y el tiempo al que se huele en la olfatometría, según la fórmula:

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

t_{Ri} = Tiempo de retención al que se ha detectado el odorante

t_{Rz} = Tiempo de retención del alcano anterior al odorante detectado

$t_{R(z+1)}$ = Tiempo de retención del alcano posterior, siendo z el número de carbonos del alcano

Una vez recopilados todos los datos proporcionados por los jueces (tiempo de detección, descriptor e intensidad), se procede al cálculo de los índices de retención de cada zona. Una vez calculados se agrupan en función de los tiempos de retención lineal y descriptores similares. Las percepciones con índices iguales y descripciones parecidas se consideran que pertenecen a una zona odorante del programa y que se corresponde a un mismo compuesto.

Agrupadas las zonas odorantes, se calcula la frecuencia modificada (FM%) para cada una de ellas, siguiendo la ecuación de Dravnieks^[18]. Se consideran relevantes las zonas con una frecuencia superior a 25%, si es inferior a ese valor, no se considera como un odorante importante en el perfil olfatométrico de la muestra.

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

F%= Porcentaje de frecuencia de citación de un odorante, siendo el panel de 6 jueces, si lo detectan todos, entonces la frecuencia es del 100%.

I%= Intensidad media del odorante expresada como porcentaje del máximo de intensidad,^[18] si los 6 jueces lo detectan con una intensidad de 3, es del 100%.

Con los índices de retención y las frecuencias calculadas, se seleccionan las zonas odorantes a caracterizar. Se realiza una primera búsqueda de compuestos responsables de dichas zonas en bases de datos del laboratorio y externas como son, Pherobase y Flavornet, encontrando posibles candidatos.

3.5 Análisis GC-MS

Los análisis se realizaron con un cromatógrafo Varian 450-GC acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas de trampa iónica Saturn 2200, Varian. La columna cromatográfica fue una DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0.25 mm d.i., con un espesor de fase de 0.25 μm , precedida de una precolumna sin fase estacionaria (polaridad intermedia, desactivada) de 3 m x 0.25 mm. El gas portador era He a un flujo de 1 mL min⁻¹.

La temperatura del inyector se mantuvo a 200 °C. El programa de temperaturas del horno fue durante 3 minutos a 35 °C, aumentando hasta 220 °C con una rampa de 2 °C min⁻¹ y posteriormente hasta 240 °C a 20 °C min⁻¹. La línea de transferencia y la cámara de ionización se mantuvieron a 200 °C. El intervalo de masas adquirido fue 35 - 220 m/z. La inyección fue automática, 2 μL en modo splitless. La adquisición de señal comenzó en el minuto 11 y se alargó hasta el minuto 125.

Al igual que en el cromatógrafo de gases-olfatometría, se inyectó una mezcla de alcanos en las mismas condiciones con las que se analizaron las muestras, para localizar las zonas a identificar según el índice de retención lineal. Ahora era la única pista que teníamos ya que no existía salida olfatométrica.

3.6 Tratamiento de datos

Se realizó un test estadístico ANOVA de 1 factor, considerando como datos las intensidades; el factor, muestra y las réplicas los sniffers. El programa utilizado fue XLSTAT Software Estadístico para Excel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Control del sistema cromatográfico

El control cuidadoso y consistente de la calidad de las columnas de los cromatógrafos es de vital importancia, para la obtención de información correcta (picos bien separados y estrechos, óptima resolución y eficiencia).

La rutina en un laboratorio de análisis consiste en la inyección de la disolución Grob semanalmente y comprobación de la calidad del cromatograma (figura 4-5) controlando el ensanchamiento de los picos, las colas, además de la adsorción irreversible y degradación. También en una limpieza periódica de la columna aplicando rampas de temperatura. A lo largo del experimento podemos encontrar una pérdida de prestaciones en el cromatógrafo, normalmente atribuida a la columna.

Diferentes controles se realizan a lo largo del experimento:

- *Disolución Grob*: es una mezcla que contiene varias clases de componentes orgánicos incluidos hidrocarburos, ácidos grasos, ésteres metílicos, ácidos, bases y alcoholes.^[19,20] El orden de elución resultante y las formas de los picos cromatográficos son indicativos del tipo de columna y su condición. El análisis periódico de la mezcla Grob permite una evaluación conveniente del deterioro de las columnas durante el período de uso. En las figuras 4 y 5 aparece el cromatograma de la disolución en una columna polar y apolar, respectivamente.

Los compuestos que la constituyen son: undecano, nonanal, 2,3-butanodiol, 1-octanol, decanoato de metilo, dicitclohexilamina, undecanoato de metilo, dodecanoato de metilo, 2,6-dimetilanilina, 2,6-dimetilfenol y ácido 2-etilhexanoico.

Para interacciones con aldehídos es especialmente importante el nonanal. Mientras que la eficiencia de la columna se determina por los ésteres metílicos. Los alcoholes se usan para medir la adsorción causada por mecanismos de enlace de hidrógeno. Las interacciones ácido/base se muestran por el comportamiento de 2,6-dimetilanilina, 2,6-dimetilfenol, dicitclohexilamina y el ácido 2-etilhexanoico.

La disolución de Grob se ve fuertemente influenciada por la fase estacionaria que constituye la columna. Hecho que se observa al comparar el cromatograma obtenido en una columna polar (DB-WAX) (figura 4) y en una polar (DB5) (figura 5)

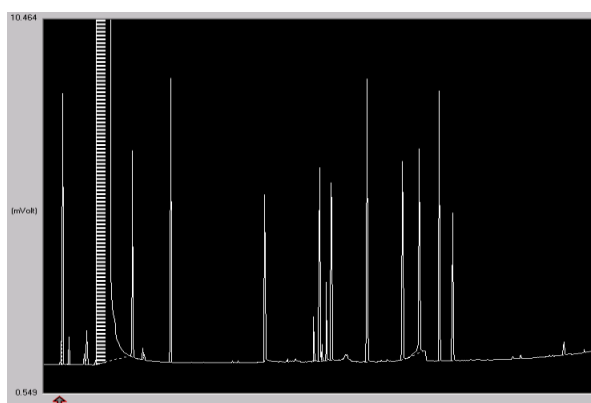


Figura 4. Cromatograma de la disolución Grob en DB-WAX

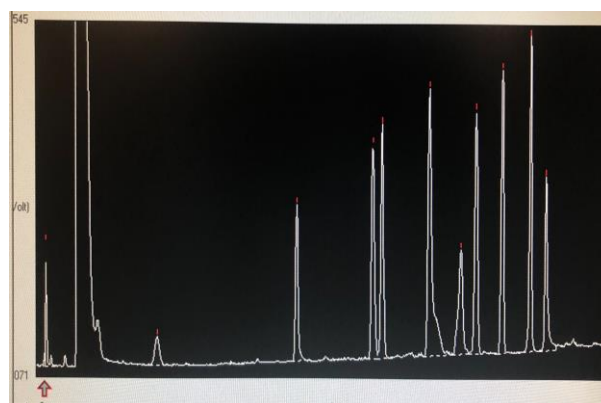


Figura 5. Cromatograma de la disolución Grob en DB5.

- *Estándar interno*, butirato de hexilo (Sigma Aldrich). Se utiliza para el control de la concentración e inyección en GC-O. Cada vez que se inyecta 1 μ L del extracto, en él hay la misma cantidad de estándar interno, por lo que los picos correspondientes al butirato de hexilo deberían ser iguales; a no ser que se haya concentrado más, entonces todos los picos serán mayores, o menos, y por tanto todos los picos serán menores. Ya que la concentración del estándar añadido es conocida, se podría calcular un factor respuesta que se podría relacionar con el área de los demás picos para realizar una cuantificación.

Un requisito para un buen estándar interno es que el pico salga separado del resto de picos del cromatograma y que sea un compuesto que no aparezca en las muestras. En la siguiente tabla 1 aparecen las áreas y tiempos de retención del pico del estándar interno en cromatogramas de diferentes días y vinos, por lo que podemos calcular la reproducibilidad de la concentración y cromatografía.

	BLOQUEADA		BP_FF		AP_N		AP_FM	
	Área/ mV·s	t _{retención} / min	Área/ mV·s	t _{retención} / min	Área/ mV·s	t _{retención} / min	Área/ mV·s	t _{retención} / min
Día 1	38926	20,113	32400	20,118	29186	20,117	37723	20,118
Día 2	37301	20,112	32870	20,115	28929	20,117	38561	20,112
Día 3	38559	20,116	32775	20,111	28374	20,113	39286	20,113
DSR%	2,22%	0,01%	0,76%	0,02%	1,43%	0,01%	2,03%	0,02%

Tabla 1. Desviación estándar relativa en porcentaje para el área y tiempo de retención del estándar interno.

Se puede ver que la reproducibilidad del área y tiempo de retención es correcta. La inyección y cromatografía de un mismo extracto es reproducible.

Cuando se realiza el mismo estudio con diferentes extractos la RSD del área del estándar interno sube al 12,8%, ya que en este caso se consideran las variaciones en la

concentración bajo corriente de nitrógeno. La reproducibilidad del tiempo de retención se mantiene del mismo orden que se observa en la tabla 1.

- *Blanco de método*, para comprobar si los pasos involucrados en la etapa de preparación del extracto adecuado para GC-O y la GC-O generan señales adicionales en el cromatograma, siendo una contaminación a tener en cuenta.

Para esto se preparó un vino sintético similar a las 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 el vino sintético que se utilizó como blanco de método, se sometió a los mismos pasos de preparación de extractos y concentración que sufriría la muestra. Inyecté en el cromatógrafo de gases-olfatometría, y realicé la olfatometría sin detectar ningún odorante. El cromatograma correspondiente mostró una serie de picos muy pequeños, que no interferían en los cromatogramas reales de las muestras.

4.2 Diferencias entre sistemas cromatográficos

En la tabla 2 pueden observarse las diferencias entre los sistemas cromatográficos unidos a olfatometría y los unidos a espectrometría de masas.

	GC-FID-GCO	GC-MS
Gas portador	H ₂	He
Caudal	3 mL min ⁻¹	1 mL min ⁻¹
Inyección	Splitless, tiempo 1 minuto	Splitless, tiempo 1 minuto
Columna	DB-WAX/ DB5	DB-WAXETR
Detector	FID	Espectrometría de masas, Ion Trap

Tabla 2. Diferencias entre GC-FID-GCO/ GC-MS

- *Gas portador*, o fase móvil gaseosa. Es inerte, no interactúa con la muestra y la conduce, una vez volatilizada, a través de la columna (que contiene la fase estacionaria) desde la entrada hasta el detector.

El tipo de gas portador a utilizar depende de su aplicación, de la sensibilidad del análisis y del detector específico. Para columnas capilares, en el caso que nos incumbe, los gases portadores son hidrógeno o helio. El helio es el más comúnmente empleado además de por ser inerte y no inflamable, por poseer propiedades físicas que permiten una cromatografía del gas de alta resolución, programada con temperatura. Aunque el hidrógeno es inflamable, su alta dispersión permite velocidades lineales más rápidas y análisis consecuentemente más cortos con la misma eficiencia de separación que la que proporciona el helio. Los análisis más cortos se traducen en producción aumentada, es decir, costos más bajos por muestra. El hidrógeno proporciona típicamente una mejor

resolución a velocidades lineales más altas que las del helio. Esas velocidades más altas no pueden ser asumidas por los espectrómetros de masas (MS), admiten 1 mL/min para poder hacer vacío. Esta es la razón por la que se usa helio cuando tenemos un MS como detector.

- *Inyección splitless*, técnica de inyección en la que la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, la cual se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente volátil de la muestra. El compuesto condensa en la cabeza de la columna, siendo el disolvente el que atrapa y concentra todos los componentes a analizar. Tras un tiempo adecuado, en nuestro caso 1 minuto, se abre en el inyector una válvula de purga con el fin de arrastrar el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector, comenzando simultáneamente un programa de temperaturas para el calentamiento de la columna para realizar el análisis. La inyección splitless presenta las siguientes ventajas. Al no darse división de la muestra, aumenta la sensibilidad, útil para el análisis de trazas. La reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna hace que pierdan importancia las pérdidas de eficacia por la inyección inadecuada.

- *Columnas DB-WAX/ DB-WAXetr*, ambas columnas capilares de polaridad elevada. La fase estacionaria, polietilenglicol, determina la selectividad de la separación. La diferencia entre ambas, como indica el nombre, ETR (extended temperatura range), es que abarca rangos mayores de temperatura.

También se utilizó una columna apolar, *DB5*, que contiene un 5% de grupos fenilo en polimetilsiloxano.

Tremendamente delicadas por su sensibilidad al oxígeno y a impurezas reactivas.^[21]

- *Detectores*, la selección del sistema de detección suele venir impuesta por el grado de selectividad que requiere el análisis.

GC-FID: un detector de ionización de llama consiste en un quemador de hidrógeno, donde se mezcla el gas portador y el analito con hidrógeno. Esta mezcla se enciende gracias a una chispa eléctrica, dando lugar a una llama de alta temperatura. Se oxidan la mayoría de los compuestos orgánicos y dan lugar a iones que se recogen produciendo una señal eléctrica que seguidamente se mide. El proceso de ionización que se da es complejo, pero se puede aproximar el número de iones producidos al número de átomos de carbono transformados en la llama.

GC-O: como detector simultáneo al FID, la nariz humana.

GC-MS (Ion Trap): Se necesita ionizar las moléculas, utilizando una separación cromatográfica previa, y que los iones formados estén en fase gaseosa. Todo ello

tiene lugar en la fuente de ionización. Los iones son acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos o magnéticos. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador.

Un aspecto que diferencia a ambas técnicas (FID y MS) es la sensibilidad, la cual se puede comparar a la vista de los cromatogramas adquiridos en ambos equipos.

Se ha escogido un compuesto que se detectó por olfatometría, pero no dio lugar a un pico cromatográfico en el cromatograma del GC-FID, octanoato de etilo. Como se puede observar en la figura 4, según los datos adquiridos por el panel de los 6 jueces, tendría que aparecer un pico para el tiempo de 20,4 minutos, pero no se detecta nada. La FM correspondiente es 46%.

En cambio, cuando se inyectó en GC-MS, en el cromatograma correspondiente (figura 5) apareció el octanoato de etilo, el cual se identificó por su espectro de masas, como se explica en el apartado 5.4.

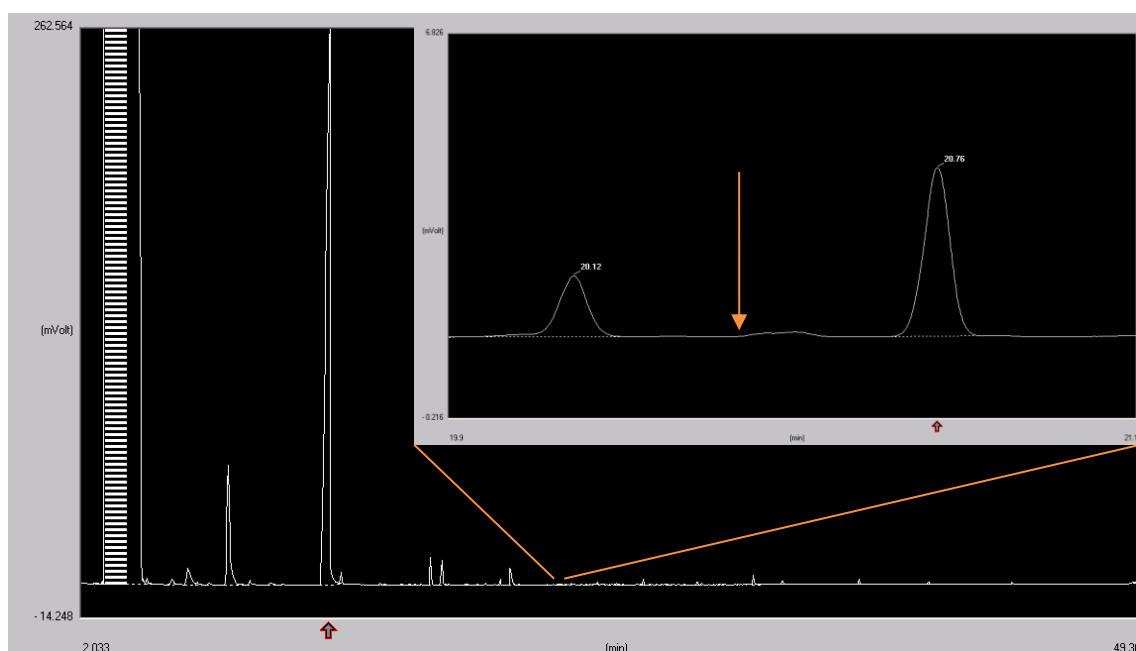


Figura 4. Cromatograma GC-FID-GCO de la muestra BLOQUEADA; sniffers: Eduardo-Aranca.

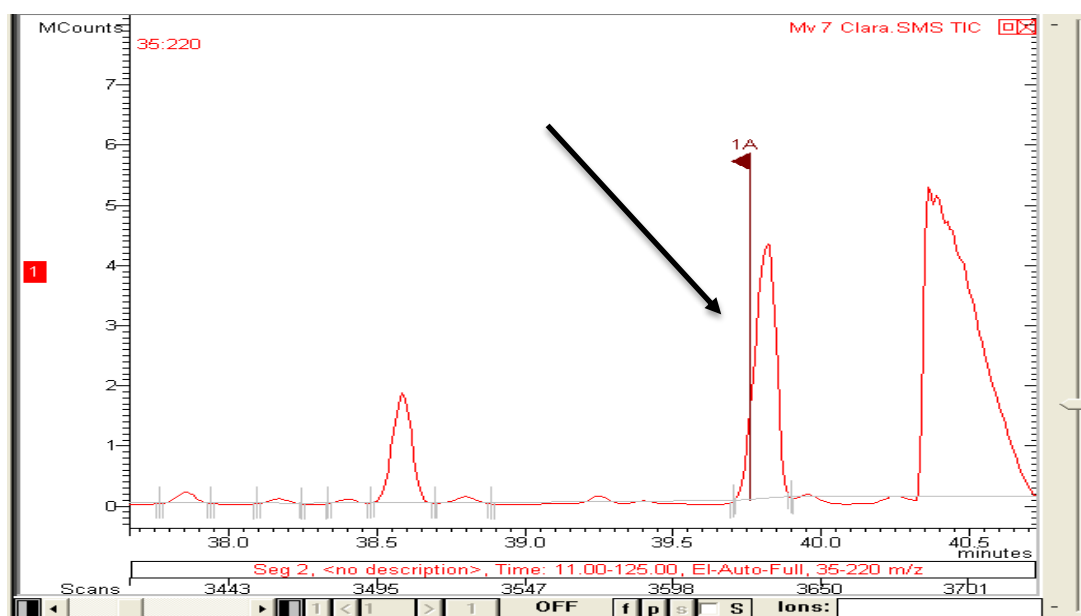


Figura 5. Cromatograma GC-MS de la muestra BLOQUEADA.

4.3 Cromatografía de gases-olfatometría, GC-O

Tabla 3. Odorantes encontrados en análisis GC-O de diferentes extractos: índices de retención, descriptores olfatométricos, identificación química y frecuencias modificadas en porcentaje (FM%)

IR			Descriptor	Identificación	BLOQUE ADA	FM%			P
	DB-5	DB- WAX				BP_FF	AP_N	AP_FM	
728	-	-	Dulce, fresa, anisado	Acetal ^c	26 ^b	26 ^b	58 ^a	- ^b	0,005
755	-	-	Disolvente, fresa, alcohólico	Propanoato de etilo ^e	20 ^b	47 ^{ab}	57 ^a	16 ^b	0,049
814	-	-	Fresa-nata, caramelo, chuchería	Isobutirato de etilo ^e	81	88	80	85	0,215
593	-	-	Mantequilla lácteo	Diacetilo ^e	- ^b	45 ^a	23 ^b	- ^b	0,010
827	1013	-	Disolvente, verde	n.i. ^e	55	62	57	43	0,714
801	1041	-	Fresa-nata, dulce, fruto rojo	Butirato de etilo ^d	66	78	66	58	0,313
846	1056	-	Cítrico dulce, chuchería	2-metilbutirato de etilo ^e	69	76	76	74	0,676
700	1066	-	Dulce, caramelo, verde	2,3 pentanodiona ^f	- ^b	- ^b	- ^b	30 ^a	0,002
853	1074	-	Medicinal, aspirina	3-metilbutirato de etilo ^e	76	78	80	74	0,916
647	1100	-	Queso, rancio	Isobutanol ^e	36	27	47	48	0,670
875	1132	-	Plátano	Acetato de isoamilo ^e	35	43	59	50	0,707
969	1198	-	Frutal, aspirina	4- metilpentanoato de etilo ^e	26 ^a	- ^b	27 ^{ab}	- ^b	0,028
736	1220	-	Amargo, queso rancio, vómito	Alcohol isoamílico ^e	89	86	89	89	0,957

996	1244	Fruta fresca, licor, dulce	Hexanoato de etilo ^d	74 ^a	41 ^b	70 ^a	60 ^{ab}	0,019
952	1292	Disolvente	Furfuril etil éter/ octanal ^g	26	13	16	-	0,247
983	1382	Fresco, vegetal, rosa	Z-1,5-octadien-3-ona ^e	- ^b	29 ^a	- ^b	- ^b	0,028
1195	1444	Reducción, gas químico	Octanoato de etilo ^d	46	36	31	23	0,186
1080	1455	Papel, polvo	E-2-Octenal ^c	- ^b	- ^b	- ^b	30 ^a	0,002
600	1461	Vinagre	Ácido acético ^e	74	80	83	74	0,420
936	1462	Patata cocida	Metional ^g	31	-	-	-	0,127
1156	1513	Verde, papel, pepino, plástico	Z-2-nonenal ^e	57	50	68	64	0,620
1167	1544	Cartón, polvo, madera, verde	E-2-nonenal ^g	29	23	21	23	0,753
1270	1622	Plástico-goma, polvo, madera	Z-2-decenal ^c	10 ^b	- ^b	23 ^{ab}	37 ^a	0,001
822	1641	Queso, tiológico, desagradable	Ácido butírico ^e	35	29	41	21	0,772
834	1681	Queso, pies, grasa	Ácido 3-metilbutírico ^e	69	81	80	83	0,830
978	1732	Patata cocida	Metional ^g	23	16	9	21	0,465
1159	1746	Queso, pis de bebé, sucio	Acetato de bencilo ^g	-	35	12	23	0,110
1388	1835	Frambuesa, fruta cocida, floral	β -Damascenona ^e	68	60	57	55	0,608
1100	1875	Medicinal, especiado	Guaiacol ^e	41	33	23	12	0,684
1116	1929	Rosas	β -feniletanol ^e	60	50	64	37	0,461
1103	2090	Sucio, estiércol	p/m-cresol ^g	29	29	20	-	0,309

n.i., Compuesto No Identificado.

p, probabilidad del Test F para que los compuestos sean significativos

Test Fisher utilizando LSD podemos agrupar entre las diferentes muestras: a, valor significativo más grande; b, más pequeño; ab, valor intermedio.

c, Identificación basada en la similaridad en DB-WAX y DB5, odorantes y patrones.

d, Identificación basada en la similaridad en DB-WAX y DB5, odorantes y espectros de masas.

e, Retención cromatográfica en DB-WAX y DB5 y descripción olfatométrica contrastada con literatura.

f, Identificación basada en la similaridad en DB-WAX, en descripción olfatométrica y confirmada por patrones.

g, Retención cromatográfica en DB-WAX y descripción olfatométrica contrastada con literatura.

En la tabla 3 se puede observar los compuestos identificados en las muestras de los diferentes vinos tintos.

Aparecen los índices de retención lineales calculados gracias a los alcanos, los cuales sirvieron para iniciar la búsqueda de los posibles responsables de las zonas de olor. Es decir, en primer lugar se realizó un análisis en una columna polar, y posteriormente, para confirmar compuestos en los que podía existir ambigüedad, se realizó en una columna apolar. Se buscaba que los índices de retención calculados a partir de los tiempos de retención en cada columna, coincidieran con los índices del compuesto a identificar. En una columna es relativamente sencillo la coelución de

diferentes compuestos, pero que esa coelución se repita en columnas de diferente fase estacionaria es prácticamente imposible.

Se aplicó un criterio en función de las frecuencias modificadas, FM% (Ver tabla 3), clasificando los compuestos según su relevancia aromática en el extracto evaluado. Los odorantes se clasificaron en función de si su valor de frecuencia modificada era superior o inferior a 25%. Si era inferior se consideró ruido, no se tuvieron en cuenta en el perfil aromático. Las zonas de olor con FM más alta son más importantes en el aroma del vino que zonas con FM más bajas.

En la tabla 3 podemos encontrar 31 zonas olorosas. Conocemos las moléculas responsables de todas las zonas, excepto de una que aparece como no identificada.

Se pueden observar compuestos como son el butirato de etilo, alcohol isoamílico, ácido acético, β -damascenona, etc, que se encuentran en las cuatro muestras por encima del 50%. Se puede considerar compuestos que forman parte de la base del aroma del vino, están siempre presentes y en concentraciones altas. En contraposición se dan compuestos que únicamente destacan en uno de los cuatro extractos, como puede ser el caso del metional o el E-2-octenal. Otros en cambio aparecen en frecuencias bajas en todos los casos, como es el metionol.

Se hizo el uso de patrones para comprobar la presencia o ausencia de algunos compuestos. Concretamente del acetal, 2,3-pentanodiona, E-2-octenal y Z-2-decenal. Al hablar de patrones, se hace referencia a una serie de disoluciones que contienen el compuesto puro. Al tratarse de compuestos aromáticos y estar en concentraciones elevadas, presentan olores muy fuertes, por lo que se encuentran aisladas en un almacén, en sus neveras correspondientes, evitando así la contaminación de los laboratorios. Preparé disoluciones de 5 ppm, salvo para el E-2-octenal que fue de 20 ppm, en diclorometano y comprobé mediante olfatometría que aparecía una zona de olor similar a la objeto de estudio.

Como clasificación adicional, para saber qué compuestos eran diferentes significativamente entre muestras se realizó un test estadístico, ANOVA de 1 factor, indicado en el apartado 4.6. Esta clasificación se desglosa dependiendo de la probabilidad que se obtuvo mediante el test a un 95% de confianza. Los compuestos que resultaron ser los responsables de las diferencias sensoriales entre vinos fueron:

- Acetal, presente en las muestras del cuadrante izquierdo abajo del PCA de la figura 1.
- 2,3 pentanodiona, presente en vinos maduros de viñas de calidad, AP_FM, en el cuadrante derecho arriba del PCA de la figura 1.

- Z-1,5-octadien-3-ona, descripción aromática vegetal, presente en vinos de bajo potencial caracterizados por sus notas verdes.

4.4 Cromatografía de gases-masas, GC-MS

Gracias a la cromatografía de gases-espectrometría de masas y junto con el factor respuesta obtenido a partir del estándar interno, se llevó a cabo la semi-cuantificación de los cuatro componentes aromáticos que constituían el extracto.

El factor respuesta corresponde a:

$$FR = \frac{\text{Concentración}_{SI}}{\text{Señal}_{SI}}$$

FR= Factor respuesta

SI= Estándar interno

Las áreas absolutas de los picos de los tres ésteres se multiplican por el factor respuesta obtenido a partir de butirato de hexilo para obtener la concentración en cada éster en cada extracto.

$$FR \times \text{Área absoluta ésteres} = \text{Masa ésteres en extracto de los 80mL de vino}$$

Para la obtención de las áreas absolutas de los ésteres se recurrió al cromatograma del GC-MS (Anexo, Figura 10). Con la ayuda de los alcanos inyectados al igual que los extractos de los vinos, se conocía el tiempo de los ésteres, observando en la tabla 4, que no coinciden con los de los de GC-O, pero manteniéndose los índices.

	IR (DB-WAX)	t _{retención} GC-O (min)	t _{retención} GC-MS (min)
Butirato de etilo	1041	6,38	14,90
Hexanoato de etilo	1244	13,38	26,90
Octanoato de etilo	1444	20,45	39,79
Butirato de hexilo (estándar interno)	1406	20,11	38,59

Tabla 4. Comparación tiempos de retención entre GC-O vs GC-MS

A dichos tiempos se obtuvieron los espectros de masas que aparecen en las figuras 6, 7, 8 y 9. Gracias a la similitud entre estos y los existentes en las librerías (Anexo, Figura 11, 12, 13 y 14) pudimos llegar a la identificación de los 3 ésteres.

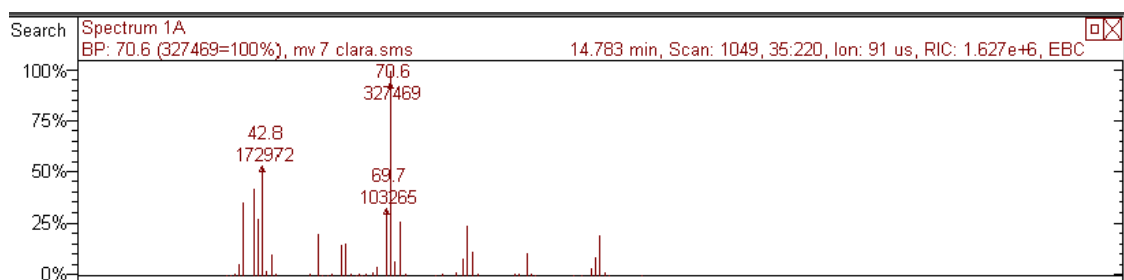


Figura 6. Espectro de masas del butirato de etilo en la muestra BLOQUEADA

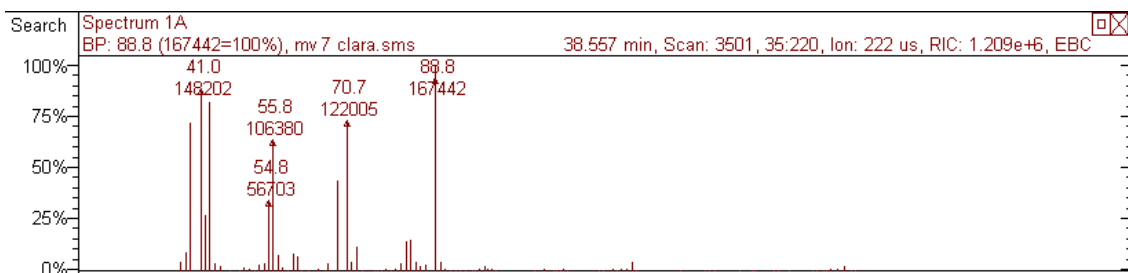


Figura 7. Espectro de masas del hexanoato de etilo en la muestra BLOQUEADA

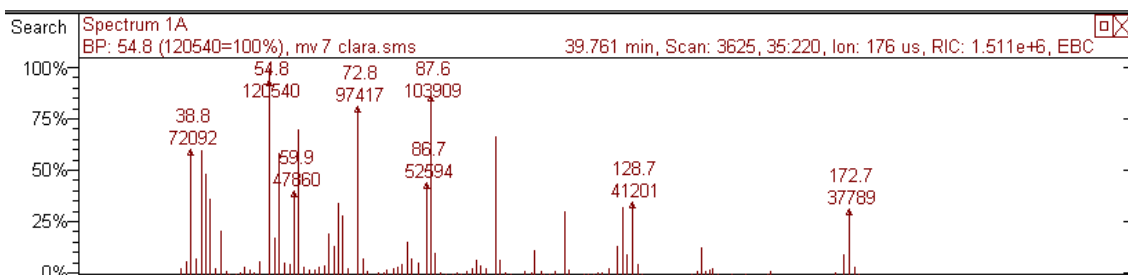


Figura 8. Espectro de masas: del octanoato de etilo en la muestra BLOQUEADA

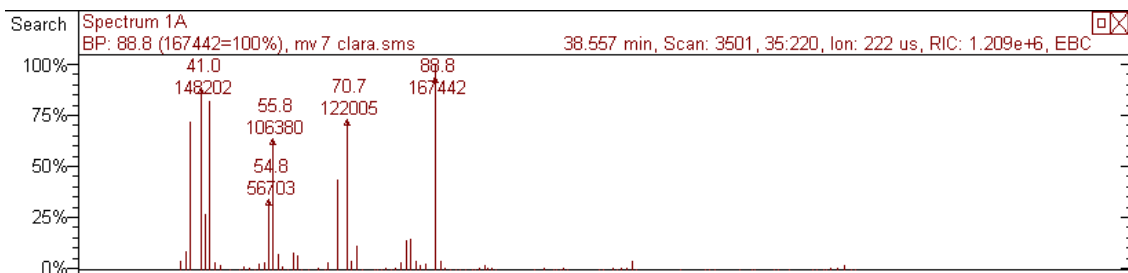


Figura 9. Espectro de masas del butirato de hexilo (estándar interno) en la muestra BLOQUEADA

Para calcular las masas de los compuestos seleccionados, se tuvo en cuenta la trazabilidad del proceso. Según la bibliografía ^[12,13] el factor de recuperación, teniendo en cuenta todas las etapas llevadas a cabo como son el arrastre del espacio de cabeza, la eficacia de las resinas Lichrolut, el eluido, etc, sería entorno al 10%. Por lo que se tuvo que considerar a la hora de realizar los cálculos.

Obteniendo las siguientes concentraciones en vino:

CONCENTRACIÓN/ $\mu\text{g/L}$	BLOQUEADA	BP_FF	AP_N	AP_FM
Butirato de etilo	208	189	236	263
Hexanoato de etilo	566	394	581	491
Octanoato de hexilo	384	193	498	420

Tabla 5. Concentraciones de 3 ésteres en las 4 muestras estudiadas

Me fijo solo en el compuesto con diferencias significativas en GC-O (tabla 3). El hexanoato de etilo, se encuentra en mayor concentración en la muestra AP_N y en menor en BP_FF (tabla 5). Esto es consecuente con que las mayores FM las poseen las muestras BLOQUEADA y AP_N, y las menores intensidades olfatométricas la muestra BP_FF.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha aprendido a controlar la calidad de un sistema cromatográfico, mediante el uso de disoluciones Grob periódicas y análisis de blancos. La metodología usada, cromatografía de gases-olfatometría y cromatografía de gases-espectrometría de masas, se ha aplicado a muestras diferentes sensorialmente. Mediante la primera se ha obtenido el perfil olfatométrico jerarquizado de los componentes responsables de los aromas de 4 vinos tintos de la variedad Moristel. Las diferencias entre muestras de compuestos volátiles como el acetal, la 2,3-pentanodiona o la Z-1,5-octadien-3-ona pueden explicar los aromas más verdes o más dulces de los diferentes vinos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Ferreira, V.; Cacho, J. Identification of Impact Odorants of Wines. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Editor, Ed.; 2009; pp 393–415.
- (2) Aznar, M.; López, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. Prediction of Aged Red Wine Aroma Properties from Aroma Chemical Composition. Partial Least Squares Regression Models. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (9), 2700–2707.
- (3) Ferreira, V.; Ortín, N.; Escudero, A.; López, R.; Cacho, J. Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50 (14), 4048–4054.
- (4) Campo, E. M. La Base Química Del Aroma de Vinos Blancos de Variedades Españolas y de Diversos Vinos Especiales .Pdf, Universidad de Zaragoza, 2006.
- (5) Ferreira, V.; Pet'ka, J.; Aznar, M.; Cacho, J. Quantitative Gas Chromatography-Olfactometry. Analytical Characteristics of a Panel of Judges Using a Simple Quantitative Scale as Gas Chromatography Detector. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1002 (1–2), 169–178.
- (6) Pollien, P.; Fay, L. B.; Baumgartner, M.; Chaintreau, A. First Attempt of Odorant Quantitation Using Gas Chromatography- Olfactometry. *Anal. Chem.* **1999**, 71 (23), 5391–5397.
- (7) Deibler, K. D.; Lavin, E. H.; Linforth, R. S. T.; Taylor, A. J.; Acree, T. E. Verification of a Mouth Simulator by in Vivo Measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, pp 1388–1393.
- (8) Roberts, D. D.; Aeree, T. E. Simulation of Retronasal Aroma Using a Modified Headspace Technique: Investigating the Effects of Saliva, Temperature, Shearing, and Oil on Flavor Release. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43 (8), 2179–2186.
- (9) Culleré, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (6), 1653–1660.
- (10) López, R.; Ortín, N.; Pérez-Trujillo, J. P.; Cacho, J.; Ferreira, V. Impact Odorants of Different Young White Wines from the Canary Islands. *J. Agric. Food Chem.*

2003.

- (11) Mayol, A. R.; Acree, T. E. Advances in Gas Chromatography-Olfactometry. In *Gas Chromatography-Olfactometry. The State of art*; 2001; pp 1–10.
- (12) San-Juan, F.; Pet'ka, J.; Cacho, J.; Escudero, A. Producing Headspace Extracts for the Gas Chromatography-Olfactometric Evaluation of Wine Aroma. *Food Chem.* **2010**, 838.
- (13) Escudero, A.; San-Juan, F.; Franco-Luesma, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. 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 Fragr. J.* **2014**, 29 (5), 296–304.
- (14) d'Acampora Zellner, B.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas Chromatography-Olfactometry in Food Flavour Analysis. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1186 (1–2), 123–143.
- (15) Richardson, A. Measurement of Fragrance Perception. *Chem. Fragrances* **1999**, 145–157.
- (16) Barata, A.; Campo, E.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V.; Cacho, J.; Ferreira, V. 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. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (6), 2543–2553.
- (17) Cacho, J.; Moncayo, L.; Palma, J. C.; Ferreira, V.; Culleré, L. 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 Res. Int.* **2012**, 49 (1), 117–125.
- (18) Dravnieks, A. *Atlas of Odor Character Profiles*; Philadelphia, 1985.
- (19) Grob, K.; Grob, G.; Grob, K. Testing Capillary Gas Chromatographic Columns. *J. Chromatogr. A* **1981**, 219 (1), 13–20.
- (20) Grob, K.; Grob, G.; Grob, K. Comprehensive, Standardized Quality Test for Glass Capillary Columns. *J. Chromatogr. A* **1978**, 156 (1), 1–20.
- (21) Ferreira, V. *Cromatorafía: Fundamentos y Práctica*; 1997.