



Departamento de
Química Analítica
Universidad Zaragoza

Trabajo de Fin de Grado

Caracterización química del aroma y sabor de
frutas autóctonas aragonesas.



Trabajo dirigido por:

Dr. Vicente Ferreira González

Trabajo realizado por:

Ángel Manuel Aragón Capone

A Elayma, por la infinita paciencia que ha tenido, por resolverme tantos quebraderos de cabeza y por toda su ayuda en general, sin la cual el trabajo no habría sido posible.

A todos mis profesores, por haber colaborado conmigo en construir día a día, mes a mes y año a año el sueño que culmina con este trabajo.

A mi familia, por haberme permitido encontrar un ejemplo de motivación, esfuerzo y apoyo sin salir de casa.

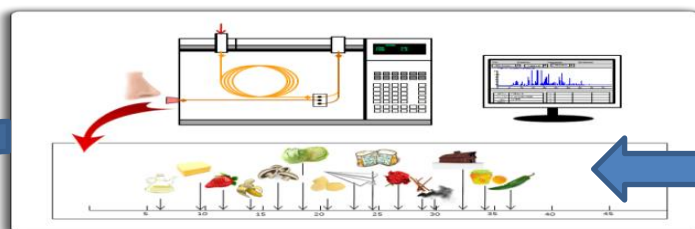
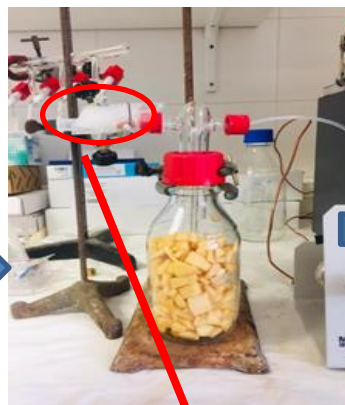
Gracias a todos.

Resumen

Se estudia la composición aromática de dos variedades de manzana diferentes, la variedad comercial *Royal Gala* y una variedad autóctona aragonesa *MA-144*. La obtención de extractos representativos a partir de las muestras se lleva a cabo por una técnica de P&T-SPE y tras su concentración, se realiza la caracterización e identificación de los compuestos odorantes. Este análisis se realiza por GC-O/FID en columnas de diferente polaridad y GC-MS. La jerarquía de los diferentes compuestos aromáticos se establece con el método AEDA. Los compuestos aromáticos identificados a destacar son el butirato, 2-metilbutirato de etilo y 3-metilbutirato de etilo importantes en ambas variedades. Por otra parte, el 1-hexanol y 1 octen-3-ona fueron relevantes exclusivamente en la variedad comercial *Royal Gala*, mientras que en la variedad autóctona los compuestos importantes propios del extracto fueron el diacetilo y el isobutirato de etilo. Resultados que refuerzan el interés en el estudio de este tipo de frutas autóctonas.

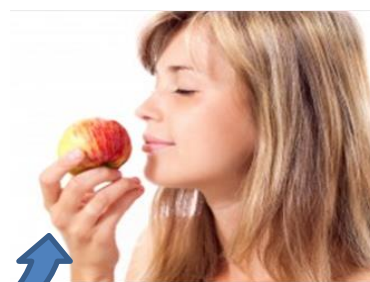
Abstract

The main purpose of the research is to understand the aromatic composition of two different apple varieties, one commercial (*Royal Gala*) and an Aragon native variety (*MA-144*). The obtention of representative extracts from the apples is made by a P&T-SPE technique and then, concentration, characterization and identification are made. The analyses are carried out with chromatographic coupled techniques of GC-O/FID in different polarity columns and GC-MS. The hierarchy of the different aromatic compounds is determined with the AEDA method. Results show that ethyl butyrate, ethyl 2-methylbutyrate and ethyl 3-methylbutyrate are important in both kind of apples. Then, hexan-1-ol and 1-octen-3-one are especially important in *Royal Gala* and diacetyl and ethyl isobutyrate are important in aragonese apple and not in *Royal Gala*. Results that encourage the interest in the study of this kind of autoctone fruits.

Graphical Abstract/Resumen Gráfico

Rich/Nutty/Brany (cooking oils)	Putrid (thiols)	Fishy/Rotten (amines)	Pungent (isothiocyanates)
Fatty/Rich (lactones)	Fruity (solid esters)	Floral/Green (alcohols/aldehydes)	Fresh/Woody (terpenes)
Earthy/Dusty (solid microbials)	Spicy/Warming (aromatics)		

The table lists various aromatic compounds and their associated odors. Each category includes chemical structures and names of compounds. For example, under 'Rich/Nutty/Brany', compounds like 2-pentanone and 2-hexanone are listed. Under 'Fruity', compounds like ethyl acetate and isoamyl acetate are listed. Under 'Floral/Green', compounds like linalool and geraniol are listed. Under 'Fresh/Woody', compounds like limonene and pinene are listed. Under 'Earthy/Dusty', compounds like geosmin and 2-phenylacetaldehyde are listed. Under 'Spicy/Warming', compounds like capsaicin and cinnamaldehyde are listed. Under 'Pungent', compounds like allyl isothiocyanate and sinigrin are listed. Under 'Putrid', compounds like 2-methylbutanethiol and 2-ethylthiol are listed. Under 'Fishy/Rotten', compounds like trimethylamine and dimethylamine are listed.



LISTADO DE ABREVIATURAS

- **AEDA:** Análisis por Dilución del Extracto Aromático (Aroma Extract Dilution Analysis)
- **GC-O:** Cromatografía de gases con detección olfatométrica
- **GC-MS:** Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
- **GC-FID:** Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas
- **MDGC:** Cromatografía de gases multidimensional
- **P&T:** Purga y Trampa (Purge and Trap).
- **SPE:** Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction).
- **SPME:** Microextracción en fase sólida (Solid Phase Microextraction).

ÍNDICE

Introducción	1
1.1 Aroma de la manzana	1
1.2 Técnicas olfatométricas. AEDA.....	3
1.3 Objetivos e importancia del estudio.....	3
Materiales y métodos.....	5
2.1 Obtención de un extracto representativo del aroma de la manzana	5
2.1.1 Preparación y acondicionamiento de la resina LiChrolut® EN.....	6
2.1.2 Preparación de la muestra.....	6
2.1.3 Extracción de los compuestos volátiles por P&T.....	6
2.1.4 Extracción en fase sólida y concentración del extracto	6
2.2 Estudio olfatométrico	7
2.2.1 Preparación de muestras para Análisis por Dilución del Extracto Aromático (AEDA).....	7
2.2.2 Análisis por GC-O de las diferentes diluciones	7
2.2.2.1 Análisis olfatométrico en columna polar DBWAX (polar)	7
2.2.2.2 Análisis olfatométrico en columna VF5-MS (apolar).....	8
2.3 Análisis del extracto por GC-MS.....	9
2.4 Análisis del extracto por MDGC (GC-O/FID-GC-O/MS)	9
Resultados experimentales y discusión	10
3.1 Obtención del extracto representativo del aroma de la manzana	10
3.1.1 Extracción de los compuestos volátiles.....	10
3.1.2 Extracción en fase sólida y concentración del extracto	10
3.2 Estudio olfatométrico por AEDA.....	11
3.3 Identificación de los compuestos odorantes	11
3.3.2 Identificación de compuestos responsables del aroma en <i>Royal Gala</i>	12
3.3.2 Identificación de compuestos responsables del aroma en manzana autóctona (<i>MA-144</i>)	14
3.4 Comparación cualitativa entre los extractos de <i>Royal Gala</i> y manzana autóctona (<i>MA-144</i>)	15
3.4.1 Coincidencias entre <i>Royal Gala</i> y <i>MA-144</i>	16
3.4.2 Particularidades de la <i>MA-144</i>	16
Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	19

Introducción

Para presentar el principal objetivo del trabajo, resulta vital recalcar previamente la función del olfato como la de un sistema sensor de especies químicas¹, con una gran responsabilidad para la supervivencia de diferentes especies². Los aromas se transmiten desde la boca hasta las fosas nasales, siendo así, el aroma la base de la información que maneja el cerebro durante el consumo de los alimentos³. En la figura 1, se muestra la vía directa y la retronasal, en la que los volátiles desprendidos durante la masticación son conducidos a las fosas nasales.

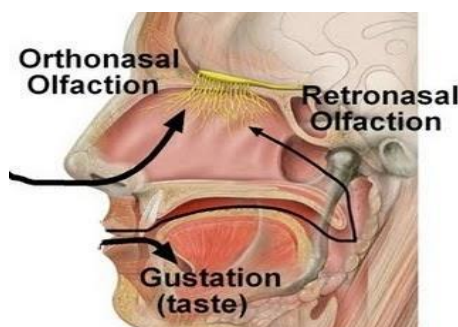


Fig.1. Vía de las señales sensoriales del sabor y olor hasta la convergencia en el hipotálamo.

De esta manera, se entiende el aroma como el conjunto de moléculas volátiles que puede ser captada por este sistema sensor ya sea por olfacción directa o mediante su liberación en el masticado y que por lo tanto, llegan a la mucosa olfativa provocando una serie de señales que terminan en última instancia en la parte primitiva del cerebro relacionada con la supervivencia y la obtención de placer. El aroma elicitado por un compuesto odorante o por un grupo de compuestos odorantes puede cambiar en función de la matriz en la que se encuentre y de las interacciones que presente con ésta⁴.

1.1 Aroma de la manzana

El perfil aromático de las manzanas lleva siendo estudiado durante más de 50 años en los que se ha llegado a la conclusión de que se componen mayoritariamente de ésteres, alcoholes, cetonas, aldehídos y éteres, variando la importancia y concentración de éstos no únicamente en función de la variedad sino de otros aspectos clave que influyen antes, durante o después del cultivo como es la maduración y su relación con el contenido aldehídico, proceso que no afecta por igual a todas las familias⁵. En la figura 2, se reflejan diferentes reacciones bioquímicas que implican la transformación de unos compuestos odorantes en otros.

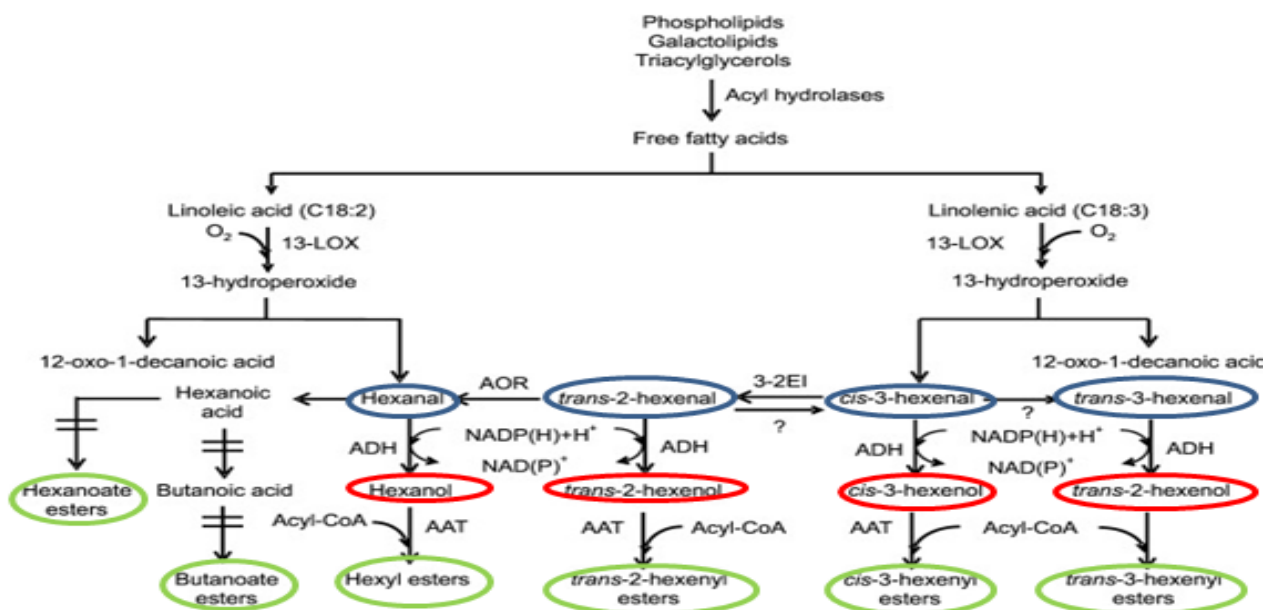


Fig. 2. Reacciones bioquímicas que reflejan la conversión de aldehído a éster⁵.

La complejidad del estudio aromático hace que sea casi obligatorio llevarlo a cabo por Cromatografía de Gases (GC)⁶ y que además, la detección olfatométrica se establezca como la técnica de referencia para separar los volátiles con olor de los que no lo tienen. La Cromatografía de Gases con detección olfatométrica (GC-O) fue desarrollada en la década de los 60 por Fuller, Steltenkamp y Tisserand. Se componía de un cromatógrafo de gases modificado que se combinaba a la nariz humana para la detección, lo que permitía asignar descriptores olfativos a los picos del cromatograma. Esta técnica puso de relieve la percepción de olores que no se reflejaban como picos en el cromatograma, lo que mostró que el sistema olfativo humano tiene un límite de detección mucho más bajo que los detectores usados en GC para determinados compuestos. De esta forma, al combinar la respuesta instrumental con la olfativa, se posibilita la identificación de los compuestos que presentan olor de entre la totalidad de la fracción volátil de una muestra⁷.

Esta técnica se ha utilizado ampliamente para el estudio de compuestos volátiles en alimentos⁸, bebidas alcohólicas⁹, e incluso materiales¹⁰.

El concepto de calidad de las manzanas ha evolucionado en la actualidad, de manera que el centro de la atención pasa de la apariencia al sabor¹¹. El sabor se compone de gusto y aroma. Mientras que el gusto se percibe por los azúcares y ácidos orgánicos, el aroma, viene dado por una combinación compleja de diferentes moléculas volátiles cuya composición difiere debido a la variedad¹² y otros factores mencionados previamente.

Por otro lado, con el fin de mejorar la certeza en los resultados frente a posibles incertidumbres debido a compuestos que presentan tiempos de retención y descriptores aromáticos similares, se emplea la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). De uso muy expandido gracias su elevada sensibilidad¹³.

A pesar de que la cromatografía sigue siendo la principal técnica para el estudio aromático, existen otras metodologías de análisis aromático rápido y en tiempo real como aquellas que utilizan nariz electrónica¹⁴.

1.2 Técnicas olfatométricas. AEDA

En la década de los 90 aparecen estudios como el de Buttery, en el que se encuentran unas 400 moléculas volátiles en tomates y únicamente 16 resultaron tener importancia en el aroma global¹⁵. Por esta razón, aparecen diversas técnicas que persiguen mediante el análisis en GC-O, asignar la importancia de un compuesto en el aroma total. Las técnicas se agrupan en técnicas de dilución, de frecuencia de detección, de tiempo intensidad y de intensidad posterior¹⁶.

Entre las técnicas olfatométricas de dilución se encuentra el método AEDA que nace en la década de los 90 como un reflejo de la tendencia a centrarse en los compuestos importantes en el aroma global. En el caso de AEDA, la importancia o jerarquía de las diferentes moléculas aromáticas en el aroma de la muestra se establece en función de las diluciones necesarias para que el olor característico de cada molécula deje de ser captado por GC-O. Es decir, una molécula aromática cuyo olor persiste y es captado en 5 diluciones sucesivas tiene más importancia en el aroma total que aquellas moléculas cuyo aroma persiste en menos diluciones. Las diluciones se realizan según la serie 1:1, 1:2, 1:4,...1:128. Se trata del método de screening de compuestos con importancia en el aroma más utilizado probablemente por su simplicidad, en la mayoría de los estudios es el primer paso de una larga investigación en profundidad¹⁷.

1.3 Objetivos e importancia del estudio

Los cultivos de manzana en España se sitúan en zonas de llanura en climas con altas temperaturas y bajos niveles de humedad en verano y Aragón se posiciona como la segunda comunidad autónoma de mayor producción de manzana en España (15,2%, únicamente por detrás del 30,3% de Cataluña) centrando sus cultivos en el Valle del Ebro. El cultivo de la manzana sufre actualmente un descenso en la producción y en el volumen económico que hace que sea necesario una innovación y la implantación de nuevos productos para frenar esta tendencia. Es por esta razón, ligada a un interés medioambiental de preservación de variedades autóctonas, por la que nace un interés en el impulso de variedades autóctonas que supondrían un salto de calidad, producción y distinción en el mercado¹⁸.

Esta revolución comienza en el laboratorio, donde se lleva a cabo el estudio del perfil aromático de diferentes variedades de manzanas autóctonas aragonesas. Precisamente, este trabajo tiene como **objetivo fundamental** la extracción e identificación de los compuestos responsables del aroma en una variedad de manzana autóctona procedente de Ligüerre, variedad genética *MA-144* recogida el 24/10/2018 y la variedad comercial *Royal Gala*, obtenida el 16/12/2018 de un supermercado.

Este estudio se compone de diferentes etapas que persiguen diferentes objetivos mediante la aplicación de las técnicas pertinentes y materiales adecuados. Con vista a evaluar aspectos del aroma de la manzana autóctona que la puedan acercar al consumidor.

Para ello se llevan a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Extracción representativa de los compuestos volátiles causantes del aroma de las manzanas *MA-144* (variedad autóctona de Aragón) y *Royal Gala* (variedad comercial) empleando la técnica de extracción de sistema de purga y trampa (P&T)¹⁹. Seguida de una extracción en fase sólida (SPE).

- Identificación de los compuestos responsables del aroma en cada variedad (y de su importancia relativa) empleando:
 - Cromatografía de Gases acoplada a olfatometría (GC-O) mediante la técnica olfatométrica AEDA.
 - Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Materiales y métodos

El proceso que tiene lugar desde que se obtiene la muestra a estudiar, hasta el propio análisis, que finaliza con la identificación y correlación de las señales obtenidas con sus correspondientes aromas, se divide en diferentes etapas, cada una con su técnica, objetivos y materiales particulares.

Los materiales usados son:

- Sistema de vacío (vacuum manifold) (Agilent Technologies, CA, EEUU).
- Jeringa de 10 μ L (Hamilton Company, NV, EEUU).
- Micropipetas de 20 ,200 μ L (Socorex, Suiza) y 1000 μ L (Mettler Toledo, OH, EEUU).
- Cartucho de 3 mL de polipropileno (Varian, CA, EEUU).
- Frits de polietileno para cartuchos de 3 mL (Supelco, PA, EEUU).
- Frascos de vidrio de borosilicato PyrexTM de 500 mL (FisherScientific, Reino Unido).
- Reservorio de 75mL (Varian, CA, EEUU).
- KDerna (Supelco, PA, EEUU).
- Viales inserto (ALWSCI Technologies, China).
- Viales de 4 mL (ThermoScientific, MA, EEUU).

Los reactivos usados son:

- Resina adsorbente LiChrolut[®] EN (Merckmilipore, Darmstad, Alemania).
- Diclorometano (FisherScientific, Reino Unido).
- Metanol (FisherScientific, Reino Unido).
- Butirato de hexilo, utilizado como estándar interno (SigmaAldrich, MO, EEUU).
- Patrón comercial de mezcla de alcanos 1000 μ g/mL C7-C30 (Supelco, PA, EEUU).
- Patrones de diferentes compuestos aromáticos.

2.1 Obtención de un extracto representativo del aroma de la manzana

Para estudiar el aroma de las manzanas es necesario realizar la extracción de los compuestos volátiles del espacio de cabeza de las muestras y para ello se emplea un sistema de P&T-SPE que se muestra en la figura 3, en el que se visualiza la entrada de una corriente de gas inerte como el N₂, la muestra depositada en el Pyrex de 500 mL y en una de las bocas, el cartucho de LiChrolut[®] EN (Merckmilipore, Darmstad, Alemania).

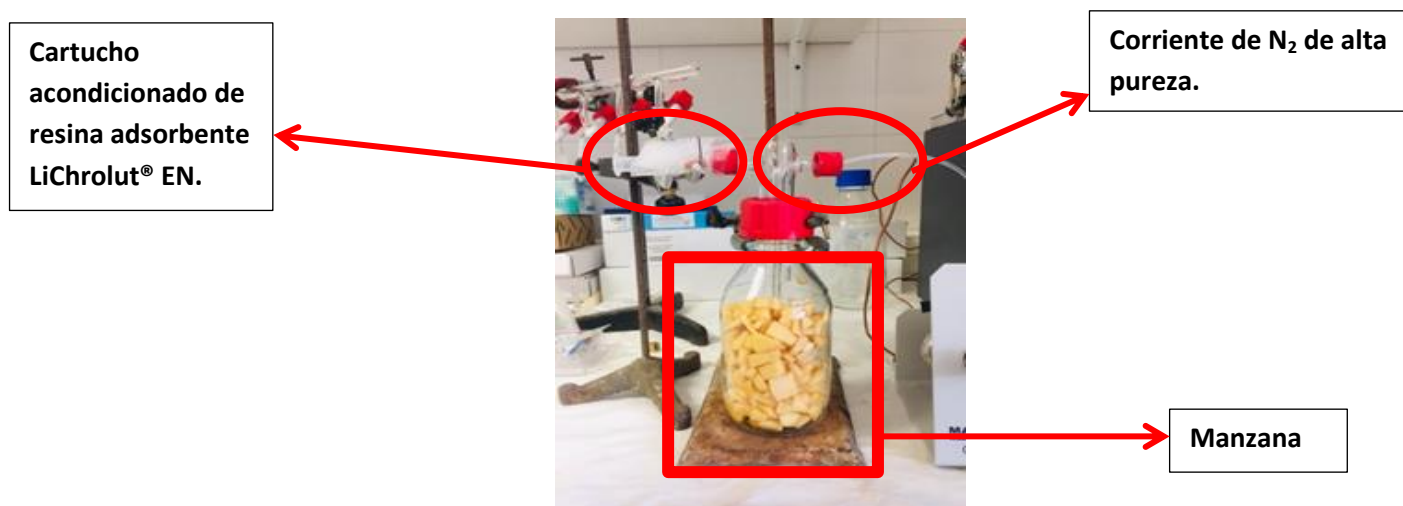


Fig.3. Montaje de P&T para extracción del aroma

2.1.1 Preparación y acondicionamiento de la resina LiChrolut® EN

Para atrapar los compuestos volátiles se emplea un cartucho de 400 mg de resina LiChrolut® EN que se prepara tomando un cartucho de 3 mL de polipropileno (Varian, CA, EEUU) en el que se introduce un frits de polietileno (Supelco, PA, EEUU) de tamaño adecuado en la base. Posteriormente, se disponen los 400 mg de resina LiChrolut® EN para acabar con la colocación de otro frits por encima de la resina y con una compactación final por compresión.

Una vez preparado el cartucho adsorbente, se procede a su acondicionamiento, necesario para que la resina LiChrolut® EN pueda desempeñar su papel. En éste, se hacen pasar por gravedad con el uso de un sistema *manifold* 20 mL de CH_2Cl_2 desde un reservorio de 75 mL. Por último, para finalizar el acondicionamiento, se produce un secado del cartucho a vacío. **Véase figura 1 del Anexo.**

2.1.2 Preparación de la muestra

Para la preparación de las muestras, se pelan y se cortan las manzanas en trozos uniformes excluyendo el corazón. Se toman aproximadamente 190 g de manzana. La rapidez en el corte de la manzana adquiere una gran relevancia debido a que se intenta evitar a toda costa la oxidación de ésta, la cual podría distorsionar la representatividad del extracto.

2.1.3 Extracción de los compuestos volátiles por P&T

Se disponen en un frasco Pyrex de 500 mL 190g de manzana, para ser sometidos a una extracción del espacio de cabeza dinámico que irá seguida de una extracción en fase sólida (P&T-SPE). Con los fragmentos de manzana en el frasco, se hace circular una corriente de 187 mL/min de N_2 de alta pureza, durante 8 horas. Los compuestos volátiles son arrastrados hacia la resina LiChrolut® EN, cuya finalidad será la retención de los compuestos volátiles del espacio de cabeza.

2.1.4 Extracción en fase sólida y concentración del extracto

Transcurridas las 8 horas de extracción, se procede al secado del cartucho, haciendo circular a través de éste una débil corriente de N_2 . Una vez seco, se realiza la extracción en fase sólida, en la que se eluyen los compuestos retenidos en la resina con 3,2 mL de una disolución (95% CH_2Cl_2 , 5% Metanol). **Véase figura 2 del Anexo .**

Una vez eluidos los compuestos de la resina, se adicionan 20 μL de un Estándar Interno (IS, por sus siglas en inglés), que en este caso se emplea butirato de hexilo de concentración 20 ppm.

Tras la adición del IS, se procede a la concentración del extracto con una débil corriente de N_2 hasta los 200 μL empleando un KDerna de 4 mL y se almacena en frío en un vial inserto hasta su posterior uso en las técnicas instrumentales. **Véase figura 3 del Anexo.**

2.2 Estudio olfatométrico

2.2.1 Preparación de muestras para Análisis por Dilución del Extracto Aromático (AEDA)

La preparación de extractos para realizar el AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) se realiza a partir del extracto concentrado con una dilución 1:1 en diclorometano. La disolución resultante se diluye a su vez a la mitad y hasta alcanzar la sexta dilución, que equivale a un factor de dilución (FD) igual a 64. Es decir; $FD=2^n$, siendo n el número de diluciones realizadas.

2.2.2 Análisis por GC-O de las diferentes diluciones

Con el fin de validar las olfatometrías el *sniffer* es entrenado mediante un procedimiento indicado por el laboratorio²⁰.

El análisis por GC-O se lleva a cabo mediante la inyección de 1 µL de extracto en los diferentes cromatógrafos, uno de fase estacionaria polar y otro apolar. Ambos con su salida acoplada, además de a un detector FID, a un soporte que posibilita la olfacción como es el ODO-1 de SGE. Con el fin de realizar una olfatometría tan independiente como sea posible, minimizando así influencias previas en el sniffer, las inyecciones se realizan al azar. Es decir, el *sniffer* desconoce la concentración del extracto del análisis.

En el caso de las olfatometrías realizadas, la manera de tomar las señales y recopilar información durante el desarrollo de la olfatometría consiste en indicar en un rango de 0,5 a 3 la intensidad (0 = no detectado, 1 = débil, olor fácilmente reconocible, 2 = olor claro pero no intenso, 3 = olor claro e intenso) siendo las puntuaciones medias permitidas.

Esta información se completa además con la anotación del tiempo de percepción sensorial y descriptores del olor captado por el *sniffer*.

2.2.2.1 Análisis olfatométrico en columna polar DBWAX (polar)

La fase estacionaria DBWAX se trata de polietilenglicol (PEG) precedido de una fase desactivada de sílica fundida (J&W. Scientific, CA, EEUU).

Cromatógrafo de gases Trace GC 2000 (Thermoquest, Italia). Con una columna DBWAX (30 m x 0,32 mm x 0,5 µm) siendo estos parámetros la longitud (m), diámetro interno (mm) y espesor de fase (µm) respectivamente. Utiliza en el estudio presente H₂ como gas portador y el programa de temperaturas utilizado es el siguiente:

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C/min)	Tiempo mantenida (minutos)
40	-	5
100	4	-
220	6	10

Tiempo total: 50 minutos

La olfatometría se divide en dos partes con el fin de mantener una sensibilidad olfativa óptima y evitar la fatiga²¹. La primera parte abarca desde el minuto 3 al 25 y la segunda, realizada en una segunda inyección desde el 25 hasta el 44.

2.2.2.2 Análisis olfatométrico en columna VF5-MS (apolar)

La fase estacionaria DB5 se trata de polimetilsiloxano y 5% difenilo (J&W. Scientific, CA, EEUU).

Cromatógrafo de gases serie 8000 (Fisons, Reino Unido). Con una columna DB5 (30 m x 0,32 mm x 1 µm) también utiliza H₂ como gas portador y el programa de temperaturas utilizado es el siguiente:

Temperatura (°C)	Rampa de temperatura (°C/min)	Tiempo mantenida (minutos)
50	-	3
100	10	-
250	8	10

Tiempo total: 37 minutos

En este caso la olfatometría se realiza desde el minuto 3 hasta el minuto 28 después de la inyección.

En la figura 4, se exponen algunos de los componentes de un cromatógrafo de gases acoplado a un puerto olfatométrico que hacen posible la captación de diferentes olores y su registro para su posterior procesamiento e identificación como compuestos aromáticos:

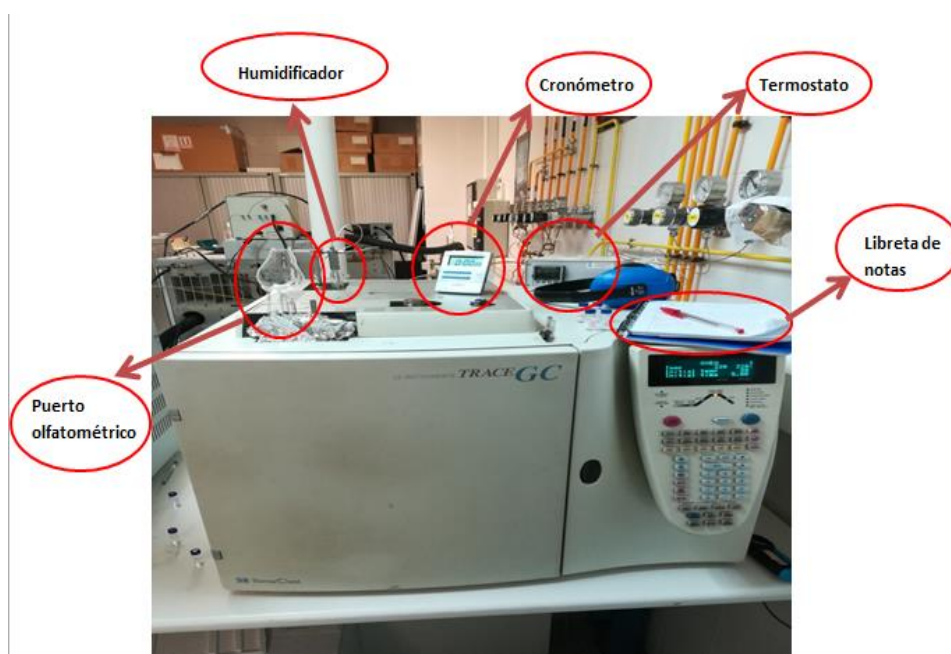


Fig. 4. Equipo y material necesario para la olfatometría.

Para más información acerca de diferentes parámetros instrumentales véase el apartado 2.2 del Anexo.

2.3 Análisis del extracto por GC-MS

El equipo utilizado para la cromatografía de gases acoplada a espectrometría (GC-MS), es *Shimadzu-QP2010* (Shimadzu Corporation, Japón). Se realiza una espectrometría de barrido o SCAN con el fin de detectar los picos que pueden resultar de interés. Los parámetros con los que el análisis se produce son:

- Mismo programa de temperaturas que en cromatógrafo *Trace GC 2000*.
- Helio como gas portador.
- Columna DBWAX (30 m x 0,25 mm x 0,5 μ m)
- Intervalo de adquisición m/z desde 40 hasta 250.

2.4 Análisis del extracto por MDGC (GC-O/FID-GC-O/MS)

Para la identificación de zonas de olor no identificadas por los métodos previamente descritos, se emplea un equipo de cromatografía *dual*, compuesto por dos cromatógrafos de gases Varian CP-3800 conectados mediante una válvula *Deans*. La primera dimensión está equipada con una columna de naturaleza polar DB-WAX (30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m) (J&W. Scientific, CA, EEUU) y cuenta con detector FID y un puerto olfatométrico ODO-1 de SGE. En la segunda dimensión cuenta con una columna de naturaleza apolar VF-5ms (30 m x 0,32 mm x 1 μ m) (J&W. Scientific, CA, EEUU) y como detectores un espectrómetro de masas Varian 240-MS (Varian, CA, EEUU) y un puerto olfatométrico.

Este equipo permite la localización de las zonas de olor en la primera columna para su posterior captura y paso directo a la segunda columna donde a la vez se puede oler el compuesto y ver su espectro de masas, lo que resulta de mucha utilidad cuando se desconoce la naturaleza de los compuestos odorantes en zonas de olor importantes que no han podido ser identificadas previamente. El esquema de funcionamiento de un equipo de estas características se muestra en la figura 5.

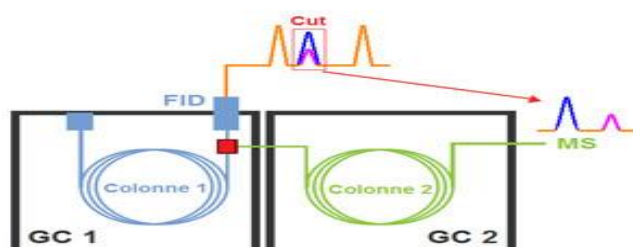


Fig.5. Esquema de funcionamiento de MDGC

Los programas de temperatura utilizados en la primera y segunda columna son los mismos que se emplean para el sistema de columna polar y apolar, respectivamente

Para más información acerca de la técnica véase apartado 2.4 del Anexo.

Resultados experimentales y discusión

3.1 Obtención del extracto representativo del aroma de la manzana

3.1.1 Extracción de los compuestos volátiles

A la hora de estudiar las diferentes técnicas analíticas para la extracción de compuestos volátiles de una muestra sólida como serían las manzanas, se justifica la elección de un sistema de P&T-SPE. Otras técnicas como puede ser la Microextracción en fase sólida (SPME) presentan una fácil saturación del material adsorbente y una pobre representación de la información analítica de la muestra.

La elección del sistema utilizado para la extracción de los compuestos volátiles de la manzana, es muy útil a la hora de evaluar el aroma de diferentes muestras. En el LAEE, se ha utilizado este sistema para estudiar muestras de alimentos como galletas, magdalenas, pechugas de pollo cocida, pasta y otros obteniéndose resultados muy satisfactorios.

Durante la extracción, resulta trascendental asegurarse que las condiciones iniciales se mantienen a lo largo de las 8 horas, comprobando que el caudal de N_2 se mantiene estable así como de la integridad de la estructura.

La elección de la resina LiChrolut® EN (copolímero de poliestireno-divinilbenceno) en lugar del muy utilizado TENAX TA, se debe a aspectos como: una excelente capacidad de recuperación para sustancias orgánicas polares y de polaridad media²² y a presentar una capacidad de retención unas 200 veces superior que la del Tenax TA; de forma que, para lograr la mismas propiedades de retención se necesitan entre 300 y 400 veces menos cantidad de LiChrolut® EN que de TENAX TA²³.

Durante la extracción, se coloca rodeando al cartucho un gel refrigerante que se cambia aproximadamente cada 30 minutos para mantener la resina a baja temperatura, ya que la retención aumenta al disminuir la temperatura evitando así el escape de los compuestos más volátiles. Es importante, que en la sustitución de la bolsa de gel, se compruebe que el funcionamiento del sistema sigue siendo el adecuado, volviendo a medir el caudal de salida y verificando olfativamente que no hay fuga de compuestos odorantes en la boca del cartucho.

3.1.2 Extracción en fase sólida y concentración del extracto

Una vez finalizada la extracción, es necesario realizar un secado de la resina debido a la adsorción de agua producida. La necesidad radica en que la elución de los volátiles adsorbidos se realiza con una disolución orgánica (CH_2Cl_2 95% -Metanol 5%).

Seguidamente, se realiza la SPE, donde adquiere una gran relevancia en el método, la adición lenta y controlada de la disolución eluyente, pues consigue evitar la formación de caminos preferenciales en la resina que impedirían el máximo arrastre posible de los compuestos.

Por último, es necesario obtener una concentración adecuada para la detección tanto por GC-O como por GC-MS, por lo que se hace pasar una corriente de N_2 lo suficientemente débil por la superficie del extracto hasta alcanzar los 200 μ L.

3.2 Estudio olfatométrico por AEDA

En ambos casos se prepara inicialmente las diluciones correspondientes para el método AEDA hasta la dilución 1-6 con FD=64.

Se realiza la olfatometría de cada una de las diluciones al azar en ambas columnas (polar y apolar). En el caso de la manzana autóctona (*MA-144*) es necesario preparar una dilución más debido a la persistencia de algunas zonas de olor. Una vez realizado todo el estudio olfatométrico, se pudieron identificar en la manzana autóctona 25 zonas de olor y otras 29 para *Royal Gala*. Obviamente contiene aromas en común, si bien se observan diferentes importancias en ambos perfiles.

3.3 Identificación de los compuestos odorantes

Una vez analizados los extractos en ambas columnas (polar y apolar), la identificación de los odorantes se realizó por comparación de los índices de retención de Kovats (IK) y los descriptores aromáticos en ambas columnas, con la información disponible en las bases de datos Pherobase, Flavornet, The Good Scents y la propia del LAEE.

Para la obtención de los índices de retención de Kovats se inyectó en cada uno de los diferentes sistemas cromatográficos empleados, una disolución comercial de alcanos entre C7 y C30 en las mismas cromatográficas en las que se analizaron cada uno de los extractos.

Para el cálculo de los IK, se aplica la siguiente fórmula:

$$IK = (100 * z) + 100 * \frac{\log t_x - \log t_z}{\log t_y - \log t_z}$$

donde:

t_z tiempo de retención del alcano anterior

t_y tiempo de retención del alcano posterior

t_x tiempo de retención del compuesto

z número de átomos de C del alcano anterior

En la figura 6 se muestra el perfil cromatográfico de la disolución comercial de alcanos empleada para el cálculo de los índices de retención y se puede observar que los alcanos están en diferentes concentraciones para facilitar su identificación (C14 y C20:20 ppm, C22-C30 (sólo pares): 40 ppm y el resto a 10 ppm).

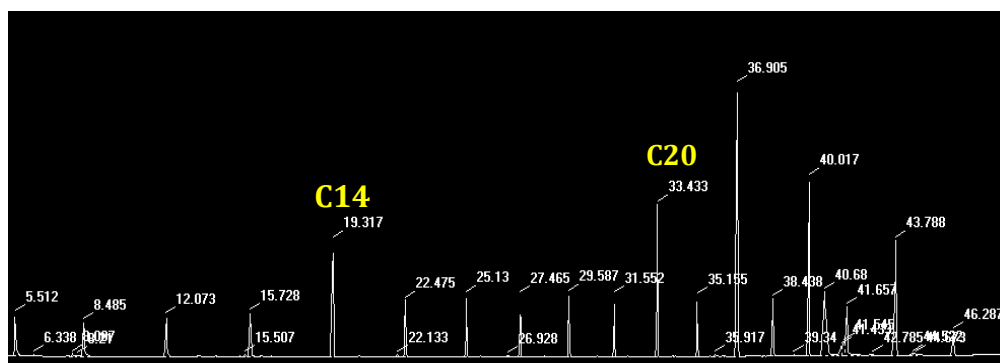


Fig. 6. Cromatograma de disolución patrón de alcanos

La confirmación de la presencia de un compuesto aromático en la manzana alcanza diversos niveles de confianza según el número de parámetros confirmatorios determinados: Índices de Retención de Kovats (IK) tanto en DBWAX como en DB5 (así como el acceso a bases de datos de éstos), la determinación por GC-MS del espectro de la sustancia, la confirmación mediante patrones o sólo mediante la consulta de fuentes bibliográficas (tanto para los IK como para los descriptores olfatométricos y los espectros de masas). De acuerdo con esto, se obtienen los resultados reflejados a continuación, dándose con una letra en el superíndice el nivel de confianza en la identificación:

3.3.2 Identificación de compuestos responsables del aroma en *Royal Gala*

En la Tabla 1 se muestra la identificación de las zonas de olor identificadas en el extracto de *Royal Gala*

TABLA 1. Compuestos aromáticos identificados en *Royal Gala*

IKDBWAX	IKDB5	Descriptor	Compuesto	FD
912	<700	Dulce/frutal	Isovaleraldehído ^B	16
1037	802	Frutal/Dulce/Fresa	Butirato de etilo ^A	1
1052	846	Fruta roja/Fresa/Medicina dulce	2-metilbutirato de etilo ^A	16
1074	850	Dulce/Disolvente alcohólico/Fruta	3-metilbutirato de etilo ^A	8
1089	812	Manzana/Uva/Verde	Acetato de butilo ^A	1
1127	878	Alcohol/Quitaesmaltes	Acetato de isoamilo ^A	1
1134	-	Fruta/Verde	(Z)-3-hexenal ^D	2
1143	941	Fresa/Frutal/Dulce/Melocotón	2-metilpentanoato de etilo ^B	2
1153	946	Vómito/Dulce/Penetrante/Graso	2-metilbutirato de propilo ^E + p/m-xileno ^D	4
1180	915	Frutal/Dulce/Floral/Plátano	Acetato de amilo ^B	1
1217	731	Desagradable/Fermentado	Alcohol isoamílico ^A	1
1286	1007	Floral/Ambientador/Plátano	Acetato de hexilo ^A	1
1303	1007	Floral/Fresco/Limón	Acetato de cis-3-hexenilo ^D	1
1307	977	Champiñón/Humedad	1-octen-3-ona ^B	16
1368	868	Floral/Herbáceo/Verde/Dulce	1-Hexanol ^A	8
1381	977	Metálico/Verde/Geranio	(Z)-1,5-Octadien-3-ona ^B	16
1390	-	Césped/Metal	(E)-3-hexen-1-ol ^D	1
1417	-	Disolvente alcohólico	3-octanol ^C	1

1462	909	Verdura hervida/Patata cocida	Metional ^B	1
1513	1149	Plástico/Humedad/Cloro	(Z)-2-Nonenal ^B	1
1545	1158	Pintalabios/Melón/Papel	(E)-2-Nonenal ^B	16
1693	1246	Frutal/Rancio/Graso	Neral ^D	1
1761	1301	Cloro/Plástico/Graso	(E,Z)-2,4-Decadienal ^D	1
1785	-	Desagradable/Rancio/Tostado	(E,Z)-2,6-Nonadienol ^D	16
1818	-	Floral/Frutal/Agradable	Dodecanoato de metilo ^D	1
1825	1314	Humedad/Verde/Masa de pan cruda	(E,E)-2,4-Decadienal ^B	2
1840	1390	Frutal/Ciruela pasa	β -Damascenona ^B	1
2098	1071	Cuero/Establo/Animal	P-cresol/M-Cresol ^B	2
2163	-	Verde/Verdura/Desagradable	n.i	2

^A Coincidencia de los índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar y apolar con el patrón puro y localización en GC-MS.

^B Coincidencia de los índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar y apolar con el patrón puro.

^C Coincidencia de índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar (y apolar) y localización en GC-MS.

^D Coincidencia de índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar (y apolar) con lo descrito en la bibliografía.

^E Identificado en el sistema de olfatometría dual.

n.i.: Zona de olor no identificada.

Como se puede observar en la tabla 1, para la zona de olor localizada en 1153 (columna polar y 946 columna apolar) fue necesaria la utilización del sistema MDGC debido a que era un compuesto de importancia en el extracto (FD=4) y no había sido posible su identificación con los otros métodos. Al realizar el análisis se identificó un pico perteneciente al 2-metilbutirato de propilo (olor dulce y frutal según las bases de datos de Pherobase y TheGoodScentsCompany). Esta zona se describía además de dulce, como graso y penetrante por lo que podemos pensar que existe en la columna polar una coelución de este éster con el p- y/o m-xileno, los cuales se describen en la literatura como punzantes y grasos según las mismas bases de datos. $IRDBWAX_{p-XILENO} = 1149^{24}$ y $IRDBWAX_{m-XILENO} = 1150^{25}$.

También se daría una coelución entre el acetato de hexilo y el acetato de cis-3-hexenilo en la columna DB5 ($IRDB5_{ACETATO DE HEXILO} = 1008^{26}$) frente a ($IRDB5_{ACETATO DE CIS-3-HEXENILO} = 1007^{26}$), ya que la similitud de sus olores característicos (florales, verdes y frutales según las fuentes de Pherobase y TheGoodScentsCompany) provoca que no se pueda identificar esa zona de olor en GC-O en DB5 con uno de los dos candidatos en particular.

3.3.2 Identificación de compuestos responsables del aroma en manzana autóctona (MA-144)

En la Tabla 2 se muestra la identificación de las zonas de olor identificadas en el extracto de *Royal Gala*

TABLA 2. Compuestos aromáticos identificados en MA-144

IKDBWAX	IKDB5	Descriptor	Identificación	FD
914	<700	Frutal/Fresa	Isovaleraldehído ^B	8
929	<700	Dulce/Fresa	Pentanal ^B	2
946	713	Fruta roja/Dulce	Propanoato de etilo ^B	2
957	-	Chocolate/Dulce/Tostado/Café	n.i	16
974	760	Frutal/Dulce/Melocotón/Fresa	Isobutirato de etilo ^A	32
979	<700	Fresa-nata/Mantequilla/Lácteo	Diacetilo ^B	32
1012	778	Fresco/Dulce/Fresa	Acetato de isobutilo ^A	4
1037	801	Frutal/Fresa ácido	Butirato de etilo ^A	32
1053	846	Dulce sintético/Fruta roja/Fresa sintético	2-metilbutirato de etilo ^A	128
1072	850	Fruta del bosque/Dulce/Medicinal	3-metilbutirato de etilo ^A	32
1109	<700	Alcohol/Licoroso/Mal aliento	Isobutanol ^A	1
1141	941	Dulce/Fruta roja/Fresa	2-metilpentanoato de etilo ^B	2
1220	742	Desagradable/Fermentado	Alcohol isoamílico ^A	1
1241	998	Cereza/Fresa	Hexanoato de etilo ^A	16
1254	-	Floral/Fresco	(E)-2-Metil-2-butenato de etilo ^D	1
1292	-	Mantequilla/Yogurt/Bayas	Acetoína ^D	1
1307	978	Champiñón/Humedad	1-octen-3-ona ^B	4
1315	-	Frutal/Dulce/Metal/Cuero	n.i	4
1352	1095	Vainilla/Postre/Dulce/Frutal	Heptanoato de etilo ^C	16
1380	978	Metálico/Verde/Geranio	(Z)-1,5-Octadien-3-ona ^B	4
1445	1195	Coco/Floral/Ambientador/Jabón	Octanoato de etilo ^C	2
1465	909	Verdura hervida/Patata cocida/Comida	Metional ^B	16
1514	1149	Plástico/Humedad/Cloro	(Z)-2-Nonenal ^B	2
1545	1165	Pintalabios/Melón/Papel	(E)-2-Nonenal ^B	4
1722	1186	Fruta/Dulce/Anisado/Floral	α -Terpineol ^D	8

^A Coincidencia de los índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar y apolar con el patrón puro y localización en GC-MS.

^B Coincidencia de los índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar y apolar con el patrón puro.

^C Coincidencia de índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar (y apolar) y localización en GC-MS.

^D Coincidencia de índices de retención y descriptores aromáticos en columna polar (y apolar) con lo descrito en la bibliografía.

n.i.: Zona de olor no identificada.

3.4 Comparación cualitativa entre los extractos de *Royal Gala* y manzana autóctona (MA-144)

Para realizar el análisis comparativo entre los extractos de ambas manzanas, se abordan aspectos como la composición jerárquica aromática que presenta cada uno, la naturaleza y percepción de los compuestos que forman el aroma total, los aromas que presentan en común y en particular, aquellos con importancia notable en cada una de las variedades.

En la Tabla 3 se muestra la comparación de las diferentes zonas de olor identificadas en ambas manzanas, sus descripciones aromáticas y el FD para el compuesto responsable de la zona.

Tabla 3. Comparación de aromas resaltando los comunes

Identificación	Descriptor	FD-MA144	FD-RG
Isovaleraldehído	Frutal/Fresa	8	16
Pentanal	Dulce/Fresa	2	-
Propanoato de etilo	Fruta roja/Dulce	2	-
n.i	Chocolate/Dulce/Tostado/Café	16	-
Isobutirato de etilo	Frutal/Dulce/Melocotón/Fresa	32	-
Diacetilo	Fresa-nata/Mantequilla/Lácteo	32	-
Acetato de isobutilo	Fresco/Dulce/Fresa	4	-
Butirato de etilo	Frutal/Fresa ácido	32	1
2-metilbutirato de etilo	Fruta roja/Fresa/Medicina dulce	128	16
3-metilbutirato de etilo	Fruta del bosque/Dulce/Medicinal	32	8
Acetato de butilo	Manzana/Uva/Verde	-	1
Isobutanol	Alcohol/Licoroso/Mal aliento	1	-
Acetato de isoamilo	Alcohol/Quitaesmaltes	-	1
(Z)-3-hexenal	Fruta/Verde	-	2
2-metilpentanoato de etilo	Dulce/Fruta roja/Fresa	2	2
2-metilbutirato de propilo+ p/m-xileno	Vómito/Dulce/Penetrante/Graso	-	4
Acetato de amilo	Frutal/Dulce/Floral/Plátano	-	1
Alcohol isoamílico	Desagradable/Fermentado	1	1
Hexanoato de etilo	Cereza/Fresa	16	-
(E)-2-Metil-2-butenato de etilo	Floral/Fresco	1	-
Acetato de hexilo	Floral/Ambientador/Plátano	-	1
Acetoína	Mantequilla/Yogurt/Bayas	1	-
Acetato de cis-3-hexenilo	Floral/Fresco/Limón	-	1
1-octen-3-ona	Champiñón/Humedad	4	16
n.i	Frutal/Dulce/Metal/Cuero	4	-

Heptanoato de etilo	Vainilla/Postre/Dulce/Frutar	16	-
1-Hexanol	Floral/Herbáceo/Verde/Dulce	8	-
(Z)-1,5-Octadien-3-ona	Metálico/Verde/Geranio	4	16
(E)-3-hexen-1-ol	Césped/Metal	-	1
3-octanol	Disolvente alcohólico	-	1
Octanoato de etilo	Coco/Floral/Ambientador/Jabón	2	-
Metional	Verdura hervida/Patata cocida	16	1
(Z)-2-Nonenal	Plástico/Humedad/Cloro	2	1
(E)-2-Nonenal	Pintalabios/Melón/Papel	4	16
Neral	Frutar/Rancio/Graso	-	1
Alpha-Terpineol	Fruta/Dulce/Anisado/Floral	8	-
(E,Z)-2,4-Decadienal	Cloro/Plástico/Graso	-	1
(E,Z)-2,6-Nonadienol	Desagradable/Rancio/Tostado	-	16
Dodecanoato de metilo	Floral/Frutar/Agradable	-	1
(E,E)-2,4-Decadienal	Humedad/Verde/Masa de pan cruda	-	2
Beta-Damascenona	Frutar/Ciruela pasa	-	1
P-Cresol/M-Cresol	Cuero/Establo/Animal	-	2
n.i	Verde/Verdura/Desagradable	-	2

3.4.1 Coincidencias entre *Royal Gala* y *MA-144*

Señaladas en color verde se muestran las zonas de olor coincidentes en ambas muestras. Entre los compuestos en común que presentan se destacan los ésteres etílicos: butirato, 2-metil y 3-metil butirato, que resultan importantes en el aroma total de ambas manzanas y que son descritos como manzana, frutar y dulce, entre otros. También el isovaleraldehído con olor frutar²⁷, 2-metilbutirato de etilo con olor característico fresa/mora²⁸ o el 3-metilbutirato de etilo con olor frutar/anisado²⁹.

Cabe destacar la presencia de ambos isómeros del nonenal (E y Z), en concreto el (E)-2-Nonenal con olor jabonoso/dulce³⁰ tendría una importancia notoria que aumenta conforme avanza el período de almacenamiento de las manzanas y más si es en condiciones de baja temperatura³¹.

También existen compuestos cetónicos comunes en ambos como es el caso de la 1-octen-3-ona que resulta más importante en *Royal Gala* o (Z)-1,5-Octadien-3-ona que presentan olores que en principio pueden resultar no muy propios de las manzanas, pero que concuerdan ya que aparecen a través de diferentes procesos de degradación³² y por la presencia de hongos.

3.4.2 Particularidades de la *MA-144*

Para finalizar la comparación, no se puede pasar por alto la presencia de compuestos muy importantes en la jerarquía aromática, de la manzana autóctona y que no se encuentran presentes en *Royal Gala*. Es el caso del diacetilo (FD=32) con un olor característico a mantequilla/fresa-nata³³ y del isobutirato de etilo (FD=32) con descripción frutar y en concreto fresa-nata³⁴, que explicarían el particular aroma general de esta manzana que olía fuertemente a mantequilla y que se diferenciaba enormemente de la manzana comercial, la cual presentaba en general un aroma a manzana roja y madura.

Conclusiones

Se obtuvieron extractos representativos de las diferentes manzanas mediante un sistema de purga y trampa seguido de una extracción en fase sólida. Para ello se tuvieron en cuenta aspectos clave, como el acondicionamiento de la resina adsorbente LiChrolut® EN, que durante el proceso pueden afectar a la representatividad de la muestra en el extracto. La gran similitud existente entre la olfacción del extracto concentrado y el olor de cada una de las manzanas permite a priori asegurar la representatividad de los extractos obtenidos.

El estudio del aroma empleando la técnica olfatométrica AEDA permitió llevar a cabo de forma sencilla un screening de los compuestos aromáticos importantes en cada una de las muestras y establecer un orden de jerarquía entre los compuestos identificados. Así es posible identificar al 2-metilbutirato de etilo como el compuesto de mayor importancia en la manzana autóctona (FD=128) y en la *Royal Gala* se identificaron con igual importancia el isovaleraldehído, 2-metilbutirato de etilo, 1-octen-3-ona, (Z)-1,5-Octadien-3-ona, (E)-2-Nonenal y (E,Z)-2,6-Nonadienol.

Además, se pueden señalar, como era de esperarse según lo descrito en diferentes fuentes bibliográficas, que son de gran importancia en ambas muestras los ésteres de tipo etílico con descriptores olfatométricos tipos frutal y dulce.

También cabe preguntarse, al identificarse compuestos con descripciones aromáticas no tan apropiados de cara al consumidor como los son la 1-octen-3-ona y la (Z)-1,5-octadien-3-ona, si estos compuestos son constitutivos o son por el contrario el resultado de una deficiente conservación de las muestras.

En particular, resulta importante y digno de destacar, el hecho de que la manzana autóctona presenta un aroma diferente respecto a la *Royal Gala*, que se debe a la presencia del diacetilo y el isobutirato de etilo en concentraciones en las que la manzana presenta un aroma general a fresa-nata y mantequilla y no el típico aroma de las manzanas del mercado, lo cual pudiera resultar en que sea una variedad comercialmente interesante, competitiva y diferente que además se adapta de forma eficiente al clima y tipo de suelos de Aragón, quizás mejor que otras variedades comerciales y que por tanto, puede derivar en un aumento de la producción y un impacto económico importante en la comunidad autónoma.

Bibliografía

1. Ferreira, V. y Fundación Ibercaja. *La química del vino*. 2015. Disponible en: <https://agroinforma.ibercaja.es/videos/puede-el-aroma-del-vino-explicarse-con-una-ecuacion-quimica> (Consultado Jun 25, 2019).
2. Ferreira, V. "Química del olor, sabor y placer en el vino". Nov 28, 2018.
3. Ferreira, V. y Heraldo de Aragón. *Aromas: el espíritu del vino*. 2019. Disponible en: <https://www.heraldo.es/noticias/gastronomia/2019/01/12/aromas-espíritu-del-vino-1286822-1311024.html>. (Consultado Jun 25, 2019).
4. Holley, A. *El cerebro goloso*, 1ª Ed.; Rubes: Barcelona, 2001; pp. 22.
5. Espino-Díaz, M.; Sepúlveda, D.R.; González-Aguilar, G. y Olivas, G.I. "Biochemistry of apple aroma: A review". *Food technology and biotechnology* **2016**, 54 (4), 375-394; DOI: 10.17113/ftb.54.04.16.4248.
6. Ferreira, V.; Ortín, N.; Escudero, A.; López, R. y Cacho, J. "Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rose' Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50 (14), 4048-4054; DOI: 10.1021/jf0115645.
7. Fuller, G.; Tisserand, G. y Steltenkamp, R. "The gas chromatograph with human sensor: perfumer model". *Annals of the New York Academic Science* **1964**, 116 (2), 711-724; DOI: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb45106.x.
8. Huang, J.; Yang, W.; y Zhang, Y. "Characterization of the Potent Odorants Contributing to the Characteristic Aroma of Beijing Douzhi by Gas Chromatography–Olfactometry, Quantitative Analysis, and Odor Activity Value". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 66 (3), 689-694; DOI: 10.1021/acs.jafc.7b04839.
9. Aceña, L. "Aplicación de cromatografía de gases-olfatometría en la caracterización del aroma de vinagre del vino, de los pistachos y del aceite de oliva". Tesis doctoral, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España, 2011.
10. Wiedmer, C.; Velasco-Schön; C. y Buettner, A. "Characterization of off-odours and potentially harmful substances in a fancy dress accessory handbag for children". *Scientific reports* **2017**, 7 (1), 1807-1811; DOI: 10.1038/s41598-017-01720-5.
11. Bonany, J.; Buehler, A.; Carbó, J. et al. "Consumer eating quality acceptance of new apple varieties in different European countries". *Food Quality and Preference* **2013**, 30 (2), 250-259; DOI: 10.1016/j.foodqual.2013.06.004.
12. Pérez, A.G. y Sanz, C. "Formation of fruit flavour". En: *Fruit and Vegetable Flavour*; Bruckner B. y Willie S.G. eds.; CRC Press: Boca Ratón (FL, EEUU), 2008; pp. 41-70.
13. Kameoka, H. GC-MS Method for Volatile Flavor Components of Foods. En: *Modern Methods of Plant Analysis*; Linskens, H.F., Jackson, J.F. eds.; Springer: Berlín (Alemania), 1986; vol.3, pp. 254-276.
14. Zulaga, C.; Díaz, A. y Quicazán, M. "La nariz electrónica, una novedosa herramienta para el control de procesos y calidad en la industria agroalimentaria". *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquía* **2011**, 18 (2), 209-217.

15. Buttery, R.G. "Quantitative and sensory aspects of flavor of tomato and other vegetables and fruit." En: *Flavor Science: Sensible Principles and Techniques*, ACS Professional Reference Book; Acree, T.E. y Teranishi, R. eds.; ACS: Washington D.C. (VA, EEUU), 1993; pp. 259-286.
16. Van Ruth, S.M. "Methods for gas chromatography-olfactometry". *Biomolecular Engineering* **2001**, 17 (4-5), 121-128; DOI: 10.1016/S1389-0344(01)00070-3.
17. Ferreira, V.; Aznar, M. y Pet'ka, J. "Aroma Extract Dilution Analysis. Precision and Optimal Experimental Design". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50 (6), 1508-1514; DOI: 10.1021/jf010933u.
18. Carbó, J. y Iglesias, I. *El cultivo del manzano en España: situación actual e innovación varietal*; Informe agroeconómico: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), España, Mar. 2018.
19. Escudero, A., Cacho, J. y 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 and Fragrance Journal* **2014**, 29 (5), 296-304; DOI: 10.1002/ffj.3204.
20. Ferreira, V.; Pet'ka, J.; Aznar, M. y Cacho, J. (2003). "Quantitative Gas Chromatography Olfactometry. Analytical Characteristics of a Panel of Judges Using a Simple Quantitative Scale as Gas Chromatography Detector". *Journal of Chromatography A* **2003**, 1002 (1-2), 169-178; DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00738-6.
21. San-Juan, F.; Pet'ka, J.; Cacho, J. y Escudero, A. "Producing Headspace Extracts for the Gas Chromatography-Olfactometric Evaluation of Wine Aroma". *Food Chemistry* **2010**, 10 (4), 831- 838; DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.03.129.
22. Merckmillipore. *Polymer-based SPE*. Disponible en: <http://www.merckmillipore.com/ES/es/analytcs-and-sample-preparation/solid-phase-extraction/polymer-based-spe/> FCB.qB.ZGMAAFCecZJ3 ww,nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F&bd=1 (Consultado: Jun 25, 2019).
23. López, P.; Batlle, R.; Nerín, C.; Cacho, J. y Ferreira, V. "Use of new generation poly (styrene-divinylbenzene) resins for gas-phase trapping-thermal desorption: Application to the retention of seven volatile organic compounds". *Journal of Chromatography A* **2007**, 1139 (1), 36-44; DOI: 10.1016/j.chroma.2006.11.005.
24. Yanagimoto, K.; Ochi, H. y Shibamoto, T. "Antioxidative Activities of Fractions Obtained from Brewed Coffee". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, 52 (3), 592-596; DOI: 10.1021/jf030317t.
25. Le Guen, S. y Demaimway, M. "Characterization of odorant compound of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* **2000**, 896 (1-2), 361-371; DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00729-9.
26. Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*, 4ª Ed; Allured Pub Corp: Carol Stream (IL, EEUU), 2005; pp. 133 y 136.
27. Carrapiso, A.I.; Jurado, A. y García, C. "Odor-Active Compounds of Iberian Hams with Different Aroma Characteristics". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50 (22), 6453-6458; DOI: 10.1021/jf025526c.
28. Ferreira, V.; Aznar, M.; López, R. y Cacho, J. "Quantitative Gas Chromatography-Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract. Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49 (10), 4818-4824; DOI: 10.1021/jf010283u.

29. Culleré, L.; Escudero, A.; Cacho, J. y Ferreira, V. "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), 1653-1660; DOI: 10.1021/jf0350820.
30. Valim, M.F.; Lin, J. y Roussef, R.L. "Gas Chromatographic–Olfactometric Characterization of Aroma Compounds in Two Types of Cashew Apple Nectar". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (4), 1010-1015; DOI: 10.1021/jf025738+.
31. Takenaka, M.; Shiina, T. y Horita, H. "Volatile Aromatic Constituents of Tree Ripened and Mature Green 'Irwin' Mango Fruits during Low Temperature Storage". *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **2016**, 75 (3), 209-212; DOI: 10.2503/jjshs.75.209.
32. Di, R. "Increasing the Methional Content in Potato through Biotechnology". En: *Biotechnology in Flavor Production*; Havkin-Frenkel, D. y F. Belanger., Eds.; John Wiley & Sons Ltd: New Jersey (EEUU), 2009; pp. 185-193.
33. Schnermann, P. y Schieberle, P. (1997). "Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45 (3), 867-872; DOI: 10.1021/jf960670h.
34. Lee, S.J. y Noble, C. "Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (27), pp. 8036-8044; DOI: 10.1021/jf034747v.

ANEXO



Figura 1 del Anexo. Acondicionamiento de la resina con sistema de vacío *manifold*.



Figura 2 del Anexo. Extracción en fase sólida (SPE) con disolvente gota a gota (95%CH₂Cl₂ y 5% Metanol) de los aromas retenidos en la resina adsorbente.

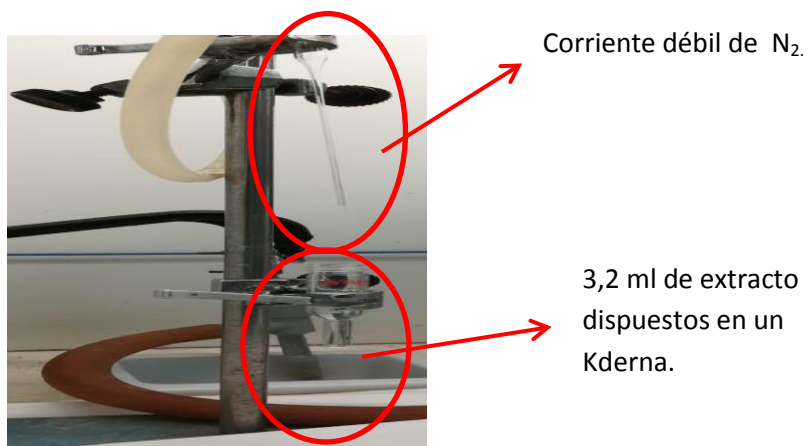


Figura 3 del Anexo. Concentración del extracto tras P&T-SPE de la muestra por evaporación facilitada por N₂.

Materiales y métodos

2.2 Estudio olfatométrico

La Cromatografía de gases se trata de una técnica analítica en la que la muestra inyectada pasa a fase gas al comienzo de la columna. La fase móvil es un gas inerte, cuya única función es la de transporte a lo largo de la columna¹. De esta manera, las moléculas en función de características como su tamaño y/o polaridad, llegan en diferentes tiempos al detector. Finalmente, se obtiene un cromatograma, a partir del cual es posible obtener información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de la muestra inyectada.

La función del termostatizador radica en evitar la condensación de aquellos analitos menos volátiles cuando salen a través del puerto olfatométrico, lo cual supondría interferencias en el resto de la olfatometría. El humidificador de aire mantiene las fosas nasales del operador húmedas con vista a evitar incomodidades que pueden llevar a distracciones y facilitando la focalización de la atención en la percepción olfativa. En el siguiente esquema quedan reflejados todos los componentes necesarios para una GC-O:

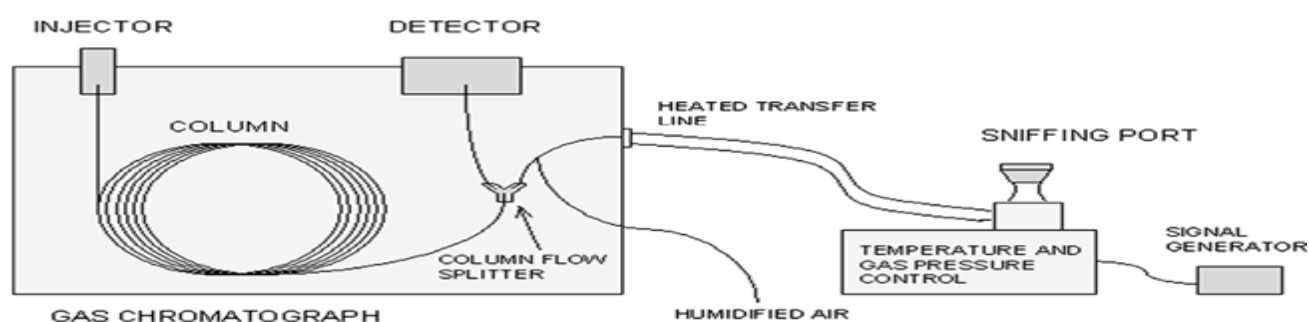


Figura 4 del Anexo. Esquema de componentes en GC-O.

El gas portador utilizado es H_2 , la diferencia entre gases portadores se da en la viscosidad (relacionada con la caída de presión) y la densidad (relacionada con la difusión de analitos). El H_2 consigue buenas eficiencias a altas velocidades (se aprecia en la gráfica de Van Deemter) aunque se debe ser precavido durante el trabajo con éste¹.

2.4 Análisis del extracto por MDGC (GC-O/FID-GC-O/MS)

El mecanismo al que se debe el desvío de los analitos al salir de la primera columna hacia un detector o hacia la trampa viene dado por un sistema de apertura y cierre de válvula, aspectos que se tienen en cuenta a la hora de tomar un rango de tiempo.

El sistema de trampa fría una vez retenida toda la muestra termina con el calentamiento de la segunda columna, dejando así que la muestra comience su camino en la segunda columna cromatográfica. Esta columna tiene como detectores a la salida de la columna además de un puerto olfatométrico un espectrómetro de masas.

El analizador de masas es de tipo *Ion Trap*, en el cual las moléculas se ionizan por el choque con electrones en un campo de 70 eV y el potencial muestreado hace que los diferentes iones abandonen secuencialmente el trap hacia el detector.

¹ Ferreira, V. *Cromatografía: Fundamentos y práctica*, 1ª Ed.; Universidad de Zaragoza: Zaragoza, 1997; pp. 61-80.

En modo SCAN o barrido, a diferencia del cuadrupolo, los iones no se descargan, lo que permite una gran sensibilidad que no se puede conseguir en el cuadrupolo debido a la saturación del detector.