



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

**CROMATOGRAFÍA DE GASES MONO
Y BIDIMENSIONAL PARA LA
DETECCIÓN DE CAMBIOS DERIVADOS
DEL PROCESADO DE ALIMENTOS**

Presentada por D^a **Pilar Manzano San José** para optar
al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por: Dr. Juan Carlos Diego Calva y Dr. José Bernal del Nozal



Universidad de Valladolid

Impreso 1T

**AUTORIZACIÓN DEL DEPARTAMENTO O COMISIÓN ACADÉMICA RESPONSABLE DEL
PROGRAMA DE DOCTORADO A LA PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL**

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

La Comisión Académica del Doctorado en QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE en su reunión de fecha 2 de Mayo de 2014, acordó autorizar la presentación de la siguiente Tesis Doctoral al considerar que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente:

Título: CROMATOGRAFÍA DE GASES MONO Y BIDIMENSIONAL PARA LA DETECCIÓN DE CAMBIOS DERIVADOS DEL PROCESADO DE ALIMENTOS

Autora: D^a Pilar Manzano San José, con D.N.I. nº 12414886-S

Director/es: Dr. Bernal del Nozal, José, con D.N.I.: 12407986-S

Dr. Diego Calva, Juan Carlos, con D.N.I.: 13935819-G

Valladolid, 5 de Mayo de 2014

Presidente Comisión Académica

Fdo.: José Luis Bernal Yagüe

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO
(para los regulados por el R.D. 56/2005, R.D. 1393/2007 y R.D. 99/2011)



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D. José Bernal del Nozal con D.N.I. nº: 12407986 S, Profesor del Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valladolid como Director de la Tesis Doctoral titulada:

CROMATOGRAFÍA DE GASES MONO Y BIDIMENSIONAL PARA LA DETECCIÓN DE CAMBIOS DERIVADOS DEL PROCESADO DE ALIMENTOS

presentada por **D^a Pilar Manzano San José**, alumna del programa DOCTORADO EN QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el DEPARTAMENTO de QUÍMICA ANALÍTICA, autoriza la presentación de la misma, considerando que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Valladolid, 5 de Mayo de 2014

El Director de la Tesis,

Fdo.: José Bernal del Nozal

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



Universidad de Valladolid

Impreso 2T

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D. Juan Carlos Diego Calva con D.N.I. nº: 13935819-G, Profesor-Colaborador del Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, de la Universidad de Valladolid como Director de la Tesis Doctoral titulada:

CROMATOGRAFÍA DE GASES MONO Y BIDIMENSIONAL PARA LA DETECCIÓN DE CAMBIOS DERIVADOS DEL PROCESADO DE ALIMENTOS

presentada por **D^a Pilar Manzano San José**, alumna del programa DOCTORADO EN QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el DEPARTAMENTO de QUÍMICA ANALÍTICA, autoriza la presentación de la misma, considerando que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Valladolid, 5 de Mayo de 2014

El Director de la Tesis,

Fdo.: Juan Carlos Diego Calva

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO

Esta investigación ha sido realizada gracias a un contrato de la Junta de Castilla y León como personal investigador de reciente titulación universitaria en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, para la realización de la Tesis Doctoral, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2007-2013, cofinanciada por el Fondo Social Europeo, a quienes expreso mi agradecimiento.

La investigación recogida en esta Memoria ha sido tutelada por el Profesor Dr. D. José Luis Bernal Yagüe y codirigida por los Profesores D. José Bernal del Nozal y D. Juan Carlos Diego Calva, a quienes deseo expresar mi agradecimiento.

Asimismo, hago extensivo mi agradecimiento a la empresa Facundo S.A. y a las Dras. Cristina García-Viguera (CEBAS-CSIC) y María del Álamo Sanza (E.T.S. de Ingenierías Agrarias, Palencia) por las muestras suministradas.

A mi padre

“Muere lentamente quien se transforma en esclavo del hábito, repitiendo todos los días los mismos trayectos, quien no le habla a quien no conoce. [...]. Muere lentamente quien no voltea la mesa cuando está infeliz en el trabajo, quien pasa los días quejándose de su mala suerte o de la lluvia incesante, [...] quien abandona un proyecto antes de iniciarlo, no pregunta de un asunto que desconoce o no responde cuando le indagan sobre algo que sabe.

Evitemos la muerte en suaves cuotas, recordando siempre que estar vivo exige un esfuerzo mucho mayor que el simple hecho de respirar. Solamente la ardiente paciencia hará que conquistemos una espléndida felicidad.”

Martha Medeiros

(Brasil, 1961)



AGRADECIMIENTOS

Debo expresar mi agradecimiento a todas las personas que habéis compartido parte de vuestra experiencia y vivencias conmigo durante todo este tiempo, no sólo por todo lo que me habéis enseñado y aportado desde el punto de vista científico, sino también por vuestra confianza, amistad y cariño.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, el Dr. Juan Carlos Diego y el Dr. José Bernal, su dedicación y apoyo, por todo lo que he aprendido junto a ellos y por su paciencia y ayuda durante estos años. A mi tutor el Dr. José Luis Bernal por haberme dado la oportunidad y por su orientación durante todo el desarrollo de la tesis.

Gracias también al resto de profesores del grupo TESEA, Susi, Laura y Maite por su apoyo desinteresado y por los buenos ratos compartidos a lo largo de estos años.

A todas las compañeras que han compartido conmigo horas de laboratorio, Esther, Ernes, Ana, Joana, Deamelys y Laura, por los momentos compartidos: cafés, viajes, despedidas, fotos, videos y risas y, como no, algún que otro problemilla analítico. Gracias a todas vosotras, pero especialmente a dos compañeras y amigas que he tenido la suerte de encontrar en este camino de la *química*. A Alma, compañera desde el principio, por todos los buenos momentos vividos dentro del laboratorio y la facultad; gracias sobre todo por la amistad que me has demostrado, apoyándome en los peores momentos personales y compartiendo conmigo confidencias, viajes, programas de radio, y mil y una historias que recordar. A Karen que, aunque te cruzaste en mi camino más tarde, has demostrado ser una de las personas que, a pesar de la distancia, siempre tendré a mi lado; gracias por los buenos ratos en tu compañía y por abrirme las puertas de tu casa española (y esperemos que en un futuro también las chilenas).

Por último, agradecer el apoyo incondicional de mi familia y mis amigos, pero especialmente a mi madre y a Kike. GRACIAS por estar siempre ahí, por vuestra paciencia infinita, por escuchar y aguantar tantas quejas acerca de cromatogramas, analitos, espectros de masas,..., porque a pesar de que no entendíais nada me supisteis animar en todo momento. Gracias por hacerme olvidar o rebajar los agobios y recordarme que el tiempo lo cura todo y lo que hoy parece muy grave...con el tiempo pasará a tener menos importancia.

A todos vosotros, ¡MUCHÍSIMAS GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	V
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	5
CAPÍTULO III. EQUIPOS CROMATOGRÁFICOS	9
3.1. GC-MS	11
3.2. GCxGC-FID	12
3.2.1. MUESTREADOR DE ESPACIO DE CABEZA	13
CAPÍTULO IV. FRACCIÓN VOLÁTIL DE VINOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DEL MODO DE ENVEJECIMIENTO	17
4.1. INTRODUCCIÓN	19
4.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS	24
4.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	27
4.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL	27
4.3.2. REACTIVOS Y PATRONES	27
4.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	28
4.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	28
4.5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	28
4.5.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS	29
4.6. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS	32
4.7. TRATAMIENTO DE MUESTRA	32
4.7.1. CRIBADO DE FACTORES	32
4.7.2. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE SUPERFICIES DE RESPUESTA	36
4.7.3. MÉTODO PROPUESTO	41
4.8. CUANTIFICACIÓN	42
4.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	42
4.9.1. LINEALIDAD	42
4.9.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	44
4.9.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN	44
4.10. APLICACIÓN DEL MÉTODO	46
4.11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
4.11.1. DETERMINACIÓN DE VOLÁTILES EN MUESTRAS DE VINO	48
4.11.2. ANÁLISIS DE VARIANZA	50
4.11.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	53
4.11.4. ANÁLISIS CLÚSTER	59
4.11.5. ANÁLISIS DISCRIMINANTE	61
4.11.5.1. DISCRIMINACIÓN CONJUNTA	61
4.11.5.2. DISCRIMINACIÓN POR ETAPAS	64
4.12. CONSECUENCIAS	68
4.13. BIBLIOGRAFÍA	69

CAPÍTULO V. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE PATATAS FRITAS EN FUNCIÓN DE LA VARIEDAD DE CULTIVO	73
5.1. INTRODUCCIÓN	75
5.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS	78
5.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	80
5.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL	80
5.3.2. REACTIVOS Y PATRONES	80
5.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	81
5.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	81
5.5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	81
5.5.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS	82
5.6. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS	85
5.7. TRATAMIENTO DE MUESTRA	85
5.7.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS	85
5.7.2. DERIVATIZACIÓN A ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS	88
5.7.3. MÉTODO PROPUESTO	89
5.8. CUANTIFICACIÓN	90
5.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO	92
5.9.1. LINEALIDAD	92
5.9.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	95
5.9.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN	95
5.10. APLICACIÓN DEL MÉTODO	96
5.11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
5.11.1. DETERMINACIÓN DE FAME EN MUESTRAS DE PATATAS FRITAS	96
5.11.2. ANÁLISIS DE VARIANZA	98
5.11.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	101
5.12. CONSECUENCIAS	106
5.13. BIBLIOGRAFÍA	107
 CAPÍTULO VI. SEPARACIÓN DE ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE GCxGC-FID	 111
6.1. INTRODUCCIÓN	113
6.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS	116
6.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	117
6.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL	117
6.3.2. REACTIVOS Y PATRONES	118
6.3.3. COLUMNAS	119
6.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	119
6.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	120
6.5.1. ESTUDIO DE DIFERENTES SETS DE COLUMNAS	121
6.5.1.1. INFLUENCIA DE LA ORTOGONALIDAD DE LA COMBINACIÓN DE COLUMNAS	124

6.5.1.2. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA Y LONGITUD DE LA SEGUNDA COLUMNA	128
6.5.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO	133
6.6. TRATAMIENTO DE MUESTRA	135
6.6.1 MÉTODO PROPUESTO	135
6.7. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES	135
6.7.1. DETERMINACIÓN DE FAME EN HOJAS DE BRÓCOLI	136
6.8. CONSECUENCIAS	141
6.9. BIBLIOGRAFÍA	142
CAPÍTULO VII. CAMBIOS PRODUCIDOS POR EL TOSTADO EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE FRUTOS SECOS	145
7.1. INTRODUCCIÓN	147
7.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS	150
7.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN	153
7.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL	153
7.3.2. REACTIVOS Y PATRONES	153
7.3.3. COLUMNAS	153
7.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN	154
7.5. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS	154
7.6. TRATAMIENTO DE MUESTRA	154
7.6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MUESTREADOR HEADSPACE	156
7.6.2 MÉTODO PROPUESTO	157
7.7. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA	157
7.7.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE LOS DIFERENTES SETS DE COLUMNAS	158
7.7.1.1. INFLUENCIA DE LA ORTOGONALIDAD DE LA COMBINACIÓN DE COLUMNAS	168
7.7.1.2. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LAS COLUMNAS	170
7.7.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO	173
7.8. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES	176
7.8.1. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL EN FRUTOS SECOS CRUDOS Y TOSTADOS	176
7.8.1.1. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE LOS FRUTOS SECOS TOSTADOS COMERCIALES	179
7.8.1.2. CARACTERIZACIÓN DE CADA FRUTO SECO EN FUNCIÓN DE SU FRACCIÓN VOLÁTIL	184
7.8.2. CREACIÓN DE PLANTILLAS DE REFERENCIA PARA CADA MATRIZ	188
7.9. CONSECUENCIAS	193
7.10. BIBLIOGRAFÍA	194
CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES	197

APÉNDICE	201
APÉNDICE DE TABLAS	203
APÉNDICE DE FIGURAS	207

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ANN	Redes neuronales artificiales, herramienta estadística
ASE	Extracción acelerada de disolventes
BF ₃	Trifluoruro de boro
CA	Análisis clúster
CCD	Diseño central compuesto
CE	Electroforesis capilar
CEBAS-CSIC	Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, perteneciente al CSIC.
CFT	Modulador de flujo capilar, basado en microfluídica
CLA	Ácidos grasos linoléicos conjugados
CO ₂	Dióxido de carbono
¹ D, ² D	Primera y segunda dimensión en GC×GC
2D, 3D	Dos y tres dimensiones
2D-GC	Cromatografía de gases bidimensional de <i>heart-cutting</i>
ECD	Detector de captura de electrones
ECVA	Análisis de variables canónicas
EI	Impacto electrónico. Fuente de iones de impacto electrónico
EFA	Ácidos grasos esenciales
FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FID	Detector de ionización de llama
×g	Fuerza centrífuga relativa, sin unidades, expresada como número de ges.
GC	Cromatografía de gases
GC×GC	Cromatografía de gases bidimensional
HPLC	Cromatografía de líquidos
HS	Headspace. Muestreador de espacio de cabeza
ICH	Comisión Internacional de Armonización
LDA	Análisis discriminante lineal
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MAE	Extracción asistida por microondas
MDGC	Cromatografía de gases multidimensional
MS, MSD	Detector de espectrometría de masas
PCA	Análisis de componentes principales
pl	Patrón interno
PLS	Regresión de mínimos cuadrados parciales
PM	Periodo de modulación
qMS	Detector de espectrometría de masas con analizador cuadrupolar
Q ₁ , Q ₂	Iones de confirmación
% Rec	Porcentaje de recuperación
% RSD	Desviación estándar relativa

SCAN	Barrido completo de iones en espectrometría de masas
SDE	Extracción-destilación simultánea
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIM	Seguimiento de iones específicos en espectrometría de masas
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
T	Ión mayoritario, de cuantificación
TESEA	GIR Técnicas de separación y análisis aplicado, Universidad de Valladolid
TMG	Trimetilguanidina
TMSH	Hidróxido de trimetilsulfonio
TOF	Detector de espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo
t_r	Tiempo de retención
$^1t_r, ^2t_r$	Tiempos de retención en la primera y segunda dimensión en GC×GC
t-T	tiempo-Temperatura
USE	Extracción ultrasónica con disolventes
ω -3, ω -6, ω -9	Ácidos grasos omega-3, omega-6 y omega-9

INTRODUCCIÓN

Los alimentos son habitualmente mezclas altamente complejas y su análisis se dirige principalmente hacia el aseguramiento de autenticidad y seguridad, el control de procesos técnicos, la determinación de valores nutricionales y la detección de compuestos con un posible efecto beneficioso o tóxico para la salud. De ahí que, un reto analítico importante sea disponer de la instrumentación y los métodos necesarios para evaluar los compuestos implicados; lo que, unido a la habilidad y experiencia del operador, llevará a conseguir la información deseada.

Actualmente, los compuestos susceptibles de ser abordados por cromatografía en fase gaseosa se discriminan bastante bien con el empleo de nuevas columnas auxiliadas por las prestaciones de los detectores, preferentemente de espectrometría de masas. No obstante, conseguir una buena separación entre compuestos muy similares en determinadas matrices requiere emplear técnicas más potentes, como puede ser la cromatografía bidimensional en sus distintas modalidades y sistemas de detección.

En el trabajo que se presenta se han pretendido examinar las posibilidades que puede aportar la cromatografía de gases bidimensional con modulador de flujo capilar, acoplada a un sistema de detección de ionización de llama, al estudio de la variación de algunos componentes durante el procesado térmico, fritura-tostado, de aperitivos o snacks muy comunes.

Ante ciertas dificultades atribuibles a la gran diferencia en la concentración entre analitos (mayoritarios-minoritarios) en ciertas matrices, se ha recurrido al empleo paralelo de la cromatografía de gases monodimensional con detección por espectrometría de masas. Estos estudios también han ayudado a tener una idea previa de determinadas condiciones y de la composición para, posteriormente, poder llevarlas al sistema bidimensional. De ahí que, en la memoria, aparezcan bien diferenciados dos apartados experimentales. El primero de ellos abarca los capítulos IV y V, con empleo preferente de alguna de esas técnicas. Seguidamente, aparecen los capítulos VI y VII, donde ya se ha empleado la cromatografía bidimensional.

En el caso de la variación de compuestos volátiles durante el tostado, se ha realizado previamente un estudio de las diferencias en cuanto a la composición de la fracción volátil de vinos, matriz sobre la que el grupo TESEA tenía experiencia previa; entre vinos sometidos a sistemas de envejecimiento clásico y acelerado. Posteriormente, la experiencia adquirida se ha extrapolado al estudio de la variación de ciertos componentes de la fracción volátil en frutos secos sometidos a diferentes condiciones de tostado.

Con relación a la otra familia de compuestos estudiados, los ácidos grasos, se ha operado de un modo similar. En primer lugar, se ha realizado un estudio del perfil de los ácidos grasos más representativos, estudiando la diferenciación de un aperitivo frito altamente consumido, como lo son las patatas fritas, en función de la variedad de patata empleada como materia prima. Como ya se ha comentado, dada la enorme diferencia en concentración entre ácidos grasos en esta matriz, se ha optado por emplear la técnica monodimensional. A continuación, el estudio se ha aplicado ampliando el número de analitos a separar y empleando la cromatografía bidimensional al estudio del perfil de ácidos grasos en hojas de brócoli, matriz en la cual estos analitos no se presentan como compuestos mayoritarios, dando especial importancia a la selección de columnas.

De este modo se han presentado los cuatro capítulos, guardando relación dos a dos, puesto que uno ha servido como lanzadera del otro.

Dos aspectos importantes en la técnica bidimensional han sido: la selección de la mejor combinación de columnas y, en su aplicación, la creación de plantillas de referencia que han permitido distinguir fácilmente entre un número amplio de muestras. En esta técnica también se ha examinado la posibilidad de conectar en línea un muestreador de espacio de cabeza estático y, siempre que ha sido necesario, se ha recurrido a un tratamiento estadístico de los datos a fin de aprovechar eficazmente la información generada.

Finalmente, se quiere indicar que no se ha tratado de hacer un estudio comparativo de ambas técnicas cromatográficas, sino más bien mostrar su complementariedad, siendo el *químico analítico* el que debe decidir cuál es prioritaria para resolver el problema planteado, sin olvidarse de la utilidad de la otra.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es contribuir al estudio de las posibilidades que ofrecen las técnicas cromatográficas bidimensionales con detector de ionización de llama (GC×GC-FID) en la tipificación y diferenciación de alimentos procesados.

Para ello, el trabajo ha precisado la consecución de unos objetivos intermedios:

- Poner a punto un método GC×GC-FID para la separación e identificación de los ácidos grasos más representativos de 6 a 24 carbonos, incluyendo los isómeros de dos ácidos grasos esenciales: ácido linoléico y linolénico.
- Poner a punto un método GC×GC-FID para la separación e identificación de los compuestos volátiles característicos de la fracción volátil de los frutos secos, tanto crudos como tostados.
- Acoplar un muestreador de espacio de cabeza estático al sistema GC×GC-FID y verificar su utilidad.
- Estudiar la complementariedad de otras técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cuando se requiera llevar a cabo análisis cuantitativos que no necesiten técnicas que incrementen el poder de resolución o la utilización de dos dimensiones para separar compuestos o isómeros de la misma familia.
- Poner a punto y validar un método GC-MS para la cuantificación de ácidos grasos de 6 a 24 carbonos presentes en las patatas fritas comerciales y establecer si existen diferencias significativas en función de la variedad de patata o el aceite de fritura, mediante medidas estadísticas descriptivas.
- Poner a punto y validar un método GC-MS para la cuantificación de los compuestos más característicos de la fracción volátil de los vinos; y establecer si existen diferencias significativas en función del sistema de envejecimiento y el origen de la madera de roble utilizada, a través de herramientas estadísticas.

EQUIPOS CROMATOGRÁFICOS

Las técnicas cromatográficas empleadas en este trabajo se engloban dentro de las técnicas de cromatografía de gases, tanto unidimensional (GC) como bidimensional (GCxGC), acopladas a distintos tipos de detectores. A continuación se detallan las características y equipamientos de cada una de ellas.

3.1. GC-MS

Se ha utilizado el equipo de cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MS) que se muestra en la **Figura 1**, con las siguientes características:



Figura 1. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de espectrometría de masas (GC-MS).

- Cromatógrafo de gases 7890 A.
- Inyector automático 7683 B con bandeja muestreadora para 100 viales y posibilidad de trabajar en modos split/splitless (con o sin división de flujo). Permite trabajar en modos de barrido completo (SCAN) y/o seguimiento de iones específicos (SIM). Utiliza helio como gas portador.
- Columna cromatográfica (naturaleza de la misma descrita en cada estudio).
- Detector de espectrometría de masas (MS) modelo 5975 C, utilizando la fuente de ionización por impacto electrónico (EI), un analizador cuadrupolo y un detector multiplicador de electrones.

- Software *MSD Chemstation* E.02.01.1177, como sistema de control, adquisición y tratamiento de datos cromatográficos.
- Librería documentada de espectros *Wiley 7N edition* (Agilent Part No. G1035B)

Todo de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU).

3.2. GCxGC-FID

El equipo utilizado de cromatografía de gases bidimensional con detector de ionización de llama (GCxGC-FID), mostrado en la **Figura 2**, estaba equipado con:



Figura 2. Cromatógrafo de gases bidimensional acoplado a detector de ionización de llama (GCxGC-FID).

- Cromatógrafo de gases 7890 A con horno capacitado para GCxGC.
- Inyector automático 7683 B con bandeja para 8 viales. Posibilidad de trabajar en modos split/splitless. Utiliza hidrógeno como gas portador.
- 2 columnas, sometidas al mismo programa de temperatura (naturaleza de las mismas a especificar en cada estudio).
- Modulador de flujo capilar G 3486 A. Sistema de transferencia que aísla, concentra e introduce los “cortes” de efluente de la primera a la segunda columna, evitando volúmenes muertos (**Figura 3**). Las características de la tecnología microfluídica

permiten realizar conexiones fiables que pueden soportar las altas temperaturas de un horno de GC.

- Detector de ionización de llama, FID. Utiliza 3 gases para formar la llama: hidrógeno, aire y nitrógeno (make-up).
- Software *ChemStation* versión B.04.01, como sistema de control del equipo GCxGC-FID y para la adquisición de datos.

Todo de Agilent Technologies.

- Software *GC Image* R2.0b5 de ZOEEX Corporation (Houston, TX, EEUU), para el tratamiento de datos y visualización de imágenes y cromatogramas en dos y tres dimensiones.

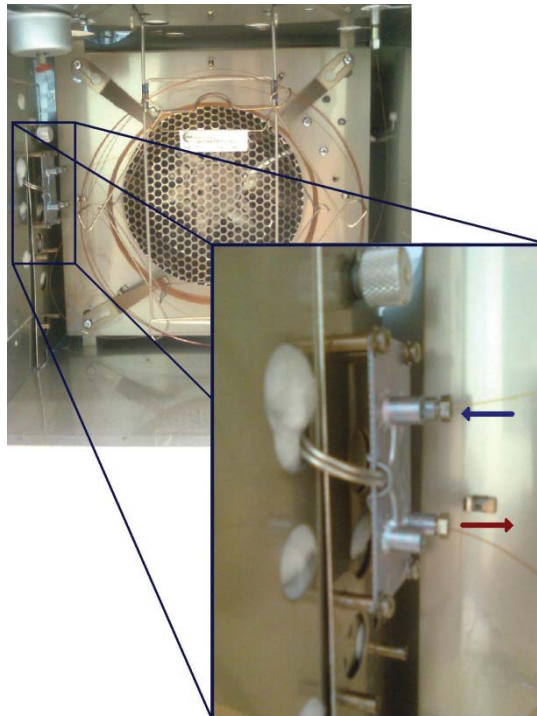


Figura 3.-Interior del horno cromatográfico y colocación de las dos columnas cromatográficas con el modulador de flujo capilar. Ampliación del modulador señalando la entrada desde la primera columna (azul) y la salida del mismo hacia la segunda columna (rojo).

3.2.1. MUESTREADOR DE ESPACIO DE CABEZA

El muestreador de espacio de cabeza, traducción del término inglés más comúnmente utilizado *headspace* (HS), es una herramienta útil para concentrar e introducir sustancias volátiles contenidas en muestras sólidas o líquidas en un cromatógrafo de gases. Concretamente se ha utilizado un muestreador HS estático HP 7694 Modelo G1290, de Agilent

Technologies. El término “espacio de cabeza” hace referencia al espacio por encima de la muestra, líquida o sólida, que se coloca en un vial sellado. Mientras que el término “estático” significa que los compuestos volátiles en el espacio de cabeza del vial se encuentran en equilibrio con los mismos compuestos en la muestra líquida o sólida.

La distribución de equilibrio de un analito entre la fase condensada (C_c), es decir, la propia matriz de la muestra, y la fase gaseosa (C_g), o sea el espacio de cabeza, se denomina coeficiente de partición, K .

$$K = \frac{C_c}{C_g}$$

Este coeficiente de partición está relacionado con el grado de solubilidad que el propio analito tiene en la matriz, por lo que valores elevados de K implican la dificultad del analito para abandonar la matriz y pasar al espacio de cabeza. Además, es bastante dependiente de la temperatura, de forma que al incrementar la temperatura durante el proceso de equilibrado de las fases se reducirá el valor de K , aumentando la sensibilidad del análisis del espacio de cabeza, como demuestra la siguiente ecuación:

$$\frac{dK}{dT} = \frac{1}{T^2}$$

El HS estático empleado proporcionó un método automatizado para llevar a cabo la introducción directa de muestras en el portal de inyección del cromatógrafo de gases bidimensional, de forma que se consiguió el acoplamiento HS-GCxGC-FID mostrado en la **Figura 4**.

El muestreador constaba de:

- Carrusel exterior para 44 viales específicos de HS de 10 ó 20 mL.
- Horno con temperatura controlada, compuesto por otro carrusel interno con capacidad para 6 viales de HS y posibilidad de mantener en reposo o agitación las muestras.
- Brazo robotizado, encargado de transportar los viales entre ambos carruseles.
- *Loop* o bucle de 1 mL, encargado de medir y almacenar el volumen a transferir al equipo cromatográfico; y línea de transferencia, a través de la cual se arrastra el volumen establecido de espacio de cabeza al portal de inyección, ambas con control de temperatura.
- Dos vías de flujo controladas desde un par de llaves de paso manuales. El flujo de gas portador, mismo gas utilizado como portador en el equipo cromatográfico, es decir,

hidrógeno; y gas nitrógeno empleado para el flujo de presurización del vial necesario para extraer los volátiles del espacio de cabeza.

- Teclado y pantalla, desde donde se controlan todas las funciones del muestreador.



Figura 4. Acoplamiento del headspace estático al cromatógrafo de gases bidimensional con detector de ionización de llama (HS-GCxGC-FID).

**FRACCIÓN VOLÁTIL DE VINOS
PARA LA DIFERENCIACIÓN DEL
MODO DE ENVEJECIMIENTO**

4.1. INTRODUCCIÓN

El aroma es una de las propiedades organolépticas más complicadas de definir y, por tanto de estudiar. En él confluyen infinidad de sustancias químicas y, su repercusión sobre las características de los alimentos da lugar a que su estudio resulte indispensable para comprender, tanto las preferencias de los consumidores, como la valoración organoléptica, en este caso, de los vinos.

El aroma de un vino es uno de los principales factores que determinan su naturaleza y calidad¹. Es resultado de numerosas reacciones químicas y bioquímicas, que comienzan en el grano de la uva con la síntesis de precursores del aroma; continúan con la generación de compuestos odorantes con la fermentación alcohólica y maloláctica, a partir de compuestos no odorantes presentes en el mosto y en el vino; y termina con la génesis de lo que se denomina aroma terciario, originado durante la maduración y envejecimiento del vino^{2,3}. Pero también se ve influenciado por diversos factores externos como el medioambiente donde se desarrolla la uva (suelo y clima) y los factores biológicos, como hongos y otros componentes de la microflora enológica⁴.

Describir el aroma de los vinos no es una tarea simple para los investigadores puesto que, actualmente, llevan identificados más de mil compuestos aromáticos de diversas familias: alcoholes, ésteres de ácidos orgánicos, éteres, aldehídos, cetonas, terpenos, etc.; y con intervalos de concentración que varían desde los cientos de mg/L hasta niveles inferiores, del orden de los $\mu\text{g/L}$ e incluso ng/L ⁵. Sin embargo, estos compuestos, sin apenas valor nutricional, establecen uno de los primeros contactos entre los alimentos y el consumidor, jugando un papel muy importante como índices de calidad del vino. Son responsables de propiedades tan importantes en un vino como son su aroma y su sabor, por ejemplo, ciertos compuestos fenólicos presentes en el vino están relacionados directamente con características organolépticas tan destacables como son: su color, astringencia y amargor^{2,3,6,7}. Además son muy importantes por su capacidad de capturar radicales libres, y tienen un papel importante en el control de la oxidación en el organismo humano⁸.

Habitualmente, los compuestos volátiles se caracterizan por un bajo peso molecular y bajo punto de ebullición lo que conduce a que puedan ser desprendidos fácilmente de la matriz hidro-alcohólica en la que se encuentran. Sin embargo, no todos los volátiles son responsables del aroma, ya que además de su volatilidad es necesario que presenten un grupo osmóforo y

que se hallen presentes en concentraciones superiores a las del umbral de detección, es decir, a la concentración mínima que puede ser percibida por una media de la población⁹.

De este modo, el estudio de la fracción de compuestos volátiles del vino resulta de gran interés desde un punto de vista de su caracterización organoléptica, así como desde una perspectiva de identificación de componentes específicos, que puedan relacionarse bien con el proceso de elaboración del vino o bien con su etapa de maduración y envejecimiento¹⁰⁻¹². Dentro de estas dos últimas etapas, el empleo de barricas de madera afecta a las propiedades organolépticas, ya que influye en la composición de sustancias volátiles y polifenólicas, que son extraídas de la madera. Estas propiedades dependen tanto de los posibles compuestos extraíbles, originalmente presentes en la madera de la barrica, como de las condiciones y la duración del proceso de maduración y envejecimiento del vino (tiempo de contacto, temperatura, etc.)^{6,13,14}. A su vez, dependen del tipo de madera empleada y del proceso de tostado al que haya sido sometida la misma¹⁵. Hoy en día, el roble es la madera que se utiliza con mayor frecuencia en el envejecimiento de los vinos, principalmente roble americano (*Quercus alba*) y roble francés (*Quercus robur* y *Quercus petraea*); aunque el castaño y, más raramente, acacia, cerezo o morera también son utilizados de vez en cuando^{16,17}. Esta influencia de la madera en las propiedades organolépticas del vino es debida principalmente a dos mecanismos. Por un lado existe una transferencia directa de compuestos volátiles responsables de ciertos matices del aroma y, por otro lado, se produce una oxidación de ciertos compuestos por el oxígeno atmosférico que pasa a través de los poros de la madera¹⁵.

Por ello, el envejecimiento de un vino en barrica de roble es una práctica tradicional que se encuentra legislada en nuestro país tanto por la normativa estatal integrada por la *Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino*¹⁸, como por la normativa europea *Reglamento (CE) Nº 7292/2008*¹⁹, siendo competencia de los diferentes Consejos Reguladores de las Denominaciones de Origen y las Asociaciones de los Vinos de Calidad hacer un seguimiento del cumplimiento de la normativa legal. De manera que las practicas de crianza en barricas de roble en los países vitivinícolas del marco europeo están muy reguladas, a diferencia de las practicas que se siguen en otros países, fundamentalmente americanos, donde la legislación es inexistente y no hay ningún organismo que regule las practicas enológicas de los productores¹⁴.

Sin embargo, el envejecimiento de los vinos en madera conlleva bastantes gastos económicos además de que las barricas ocupan mucho espacio en la bodega y su tiempo de vida no es

excesivamente largo. Por esta razón, en las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas para abaratar costes y simplificar el proceso de envejecimiento, garantizando al mismo tiempo que los volátiles derivados de la madera se liberan en el vino, consiguiendo vinos con propiedades sensoriales similares a los vinos envejecidos en barricas¹⁴. Entre estas prácticas las más habituales son las maceraciones de los vinos con fragmentos de madera²⁰ (astillas, virutas o tablonés) obtenidos a partir de recortes producidos durante la fabricación de la propia barrica y sometidos a procesos de hervido en agua y de tostado¹⁵. Estos sistemas se denominan sistemas de envejecimiento acelerado, de manera que se consiguen obtener vinos con "características de la madera" similares a los envejecidos en barrica pero en menos tiempo y con un coste menor^{21,22}. También, el uso de astillas de roble permite llevar a cabo la fermentación en tanques de acero inoxidable para obtener vinos como los fermentados en barrica, pero sin los inconvenientes técnicos de los últimos (fermentaciones de poca capacidad, dificultad en el control de la temperatura, limpieza de la barrica, etc)¹⁵.

Estas alternativas a la crianza en madera han sido una práctica extendida en los Estados Unidos, Australia y otros países, como Chile y Argentina, desde hace años, pero no ha sido una práctica legal en los países de la Unión Europea (UE) hasta octubre de 2006 cuando la UE aprobó el uso de astillas de madera y la designación y presentación del vino así tratado: *Reglamento (CE) Nº 1507/ 2006, de 11 de octubre de 2006*²³. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, aunque los compuestos fenólicos y aromáticos presentes en la madera se liberan al vino durante el tiempo de contacto entre el vino y los fragmentos de madera en sus diferentes tamaños, estos nuevos sistemas de crianza no prevén el proceso oxidativo que se produce en la barrica^{24,25}.

Para mejorar los sistemas de envejecimiento acelerados en la obtención de vinos con características idénticas a las obtenidas mediante el sistema de envejecimiento tradicional, se ha propuesto el uso de la denominada técnica de micro-oxigenación. Esta técnica permite la adición de pequeñas cantidades controladas de oxígeno durante el proceso de maduración con las astillas, imitando así el proceso oxidativo que se produce durante la crianza en barrica^{25,26}.

Por tanto, en la actualidad se están llevando a cabo cada vez más estudios enfocados hacia la diferenciación entre la composición de vinos envejecidos de forma tradicional y vinos envejecidos mediante sistemas acelerados utilizando el mismo o distinto tipo de madera de roble^{14,24,25} o en combinación con otras técnicas como la micro-oxigenación^{2,13}.

Dentro de las técnicas analíticas empleadas para llevar a cabo el análisis de compuestos volátiles en vinos²⁷, la más eficaz y más ampliamente utilizada es la GC-MS. Dentro de los detectores de masas, los más empleados son trampa de iones^{15,28,29} y sobre todo el cuadrupolo (qMS)^{7,24,26,30,31}. El detector de tiempo de vuelo (TOF)³² se utiliza de forma más habitual acoplado a la cromatografía multidimensional, concretamente la GC×GC^{33,34}.

Por otro lado, también se han encontrado trabajos en la bibliografía que complementan los resultados del detector de espectrometría de masas con otros detectores, como puede ser el detector de ionización de llama (FID)^{24,26,31} o el detector olfatométrico^{2,5,6,31}.

Otra técnica analítica empleada en menos ocasiones ha sido la cromatografía líquida (HPLC)^{14,26,32}, especialmente para la determinación de compuestos polifenólicos. Sin embargo, los resultados obtenidos la mayor parte de las veces no mejoraban los alcanzados mediante cromatografía de gases, ya que habitualmente el número de compuestos que se analizaban simultáneamente era menor que mediante GC.

Además de las técnicas cromatográficas, se han encontrado referencias al análisis de compuestos volátiles de vinos mediante espectroscopías en distintas zonas del espectro: Ultravioleta (UV), infrarrojo cercano y medio (NIR y MIR), el visible (VIS)^{27,35}. Y, en menor medida, se han encontrado investigaciones donde se ha empleado la electroforesis capilar (CE) para llevar a cabo la determinación de compuestos volátiles en vinos³⁶.

Respecto al tratamiento de muestra para la extracción de compuestos volátiles, por una parte, se citan tratamientos de muestra clásicos, como la extracción líquido-líquido^{7,13,21,30,31}, habitualmente con diclorometano como disolvente. Sin embargo, implica un consumo elevado de disolvente. Además, considerando el análisis de compuestos mayoritarios mediante cromatografía de gases se ha utilizado en ocasiones el espacio de cabeza o headspace (HS) como sistema de introducción de muestra directa¹⁰.

Frente a este tratamiento se han contemplado varias alternativas, siendo una de las principales la extracción en fase sólida (SPE)^{17,26,28,29,33}. Se trata de un método rápido, versátil y simple que permite el análisis de gran cantidad de compuestos volátiles en los vinos con resultados satisfactorios. Con esta técnica se reduce el uso de disolventes orgánicos.

Además, se están empleado otras técnicas basadas en la extracción en fase sólida, como la microextracción en fase sólida (SPME)^{5,24}, que contiene una fibra delgada cubierta con un polímero o un adsorbente y utilizada habitualmente con un sistema de introducción directa de muestra de espacio de cabeza (HS-SPME)^{14,15,34}. Otras técnicas más recientes pero menos utilizadas son la extracción acelerada de disolventes (ASE)²² y una extracción mediante una técnica que se basa en el mismo principio de equilibrio que la SPME pero con una barra de agitación de vidrio recubierta por un adsorbente, normalmente polidimetilsiloxano (*stir-bar sorptive extraction*)^{11,16}.

En cuanto al tratamiento de datos en este tipo de análisis en los que hay un elevado número de compuestos, es necesario a menudo utilizar herramientas estadísticas de análisis multivariante. En primer lugar, para llevar a cabo la comparación entre distintos tipos de muestras, lo más común es utilizar el ANOVA, cuyo fin es determinar si existen diferencias significativas entre las variables medidas^{6,11,22,31,35}.

Otra de las herramientas de estadística descriptiva más utilizadas según reflejan las citas bibliográficas, es el análisis de componentes principales (PCA)^{10,27,30,32,35}. Mediante esta herramienta se consigue reducir el número elevado de variables iniciales a unas pocas componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables de partida.

En menor medida se aplica el análisis clúster (CA), cuyo objetivo de nuevo es buscar agrupaciones existentes entre las variables medidas para poder diferenciar los vinos analizados²⁷. Los miembros de un clúster deben presentar elevada similitud, de esta forma se pueden encontrar asociaciones y estructuras que no son evidentes.

En cuanto a los análisis estadísticos predictivos empleados en el estudio de compuestos volátiles en vinos, en la mayoría de las investigaciones se aplica el análisis discriminante²⁷. En concreto el análisis discriminante lineal (LDA)^{10,27,35,36} es el más común. Por esta vía se usan algoritmos que buscan funciones o vectores discriminantes, es decir, combinaciones lineales que sean capaces de maximizar la varianza entre categorías, o lo que es lo mismo, establecer una frontera capaz de delimitar las categorías en las que se encuentran las medidas.

Otras herramientas estadísticas de clasificación presentes en la bibliografía, en menor medida, recogen procedimientos matemáticos como redes neuronales artificiales (ANN)²⁷, regresión de

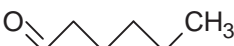
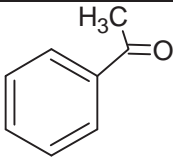
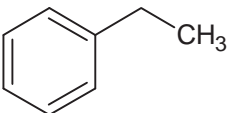
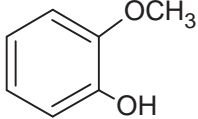
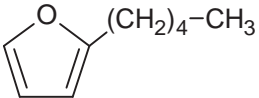
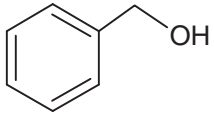

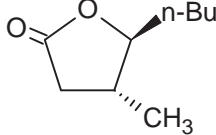
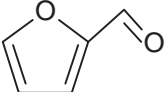
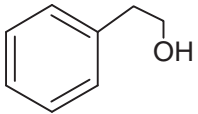
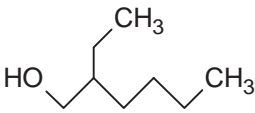
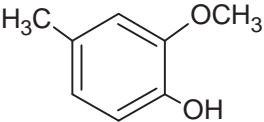
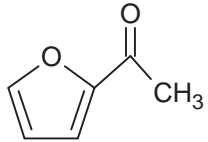
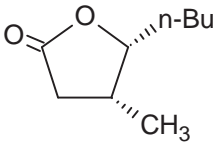
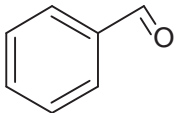
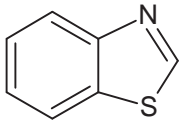
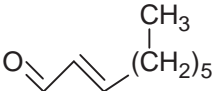
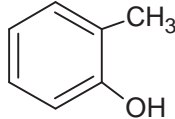
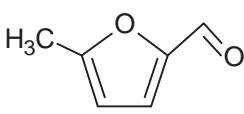
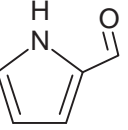
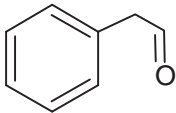
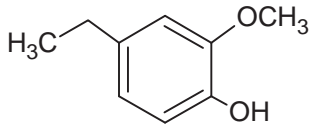
mínimos cuadrados parciales (PLS)^{29,31,35} combinado, en ocasiones, con el análisis discriminante (PLS-DA)³² y análisis de variables canónicas (ECVA)¹².

El objetivo de este trabajo ha consistido primero, en la puesta a punto y validación de un método de análisis para compuestos volátiles en vinos, mediante cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas, empleando la extracción en fase sólida como tratamiento de muestra y su optimización mediante el empleo de herramientas como el diseño de experimentos. Finalmente, aplicando el método analítico a una serie de muestras de vino envejecidas mediante diferentes sistemas (clásico en barrica y acelerados con astillas y tabloncillos), utilizando madera de roble americana y francesa, se han establecido sus perfiles aromáticos, para la discriminación de las muestras a través de análisis PCA, CA y LDA principalmente en función del modo de envejecimiento.

4.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS

La **Tabla 1** recoge los 40 compuestos volátiles que fueron seleccionados para llevar a cabo el estudio, correspondientes a los más representativos de la fracción volátil del vino y de procesos de envejecimiento del vino mediante contacto con la madera.

Tabla 1. Compuestos volátiles estudiados en la fracción volátil del vino.

Nº	Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula	Nº	Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula
1	1-hexanal (<i>n</i> -capronaldehído) C ₆ H ₁₂ O		12	1-fenil-1-etanona (acetofenona) C ₈ H ₈ O	
2	etilbenceno C ₈ H ₁₀		13	2-metoxifenol (guayacol) C ₇ H ₈ O ₂	
3	2-pentilfuranó C ₉ H ₁₄ O		14	alcohol bencílico C ₇ H ₈ O	
4	1-hexanol C ₆ H ₁₄ O		15	(±)-5-butil-4-metildihidro-2(3H)-furanona (<i>trans</i> -whiskey-lactona) C ₉ H ₁₆ O ₂	
5	2-furaldehído C ₅ H ₄ O ₂		16	2-feniletanol (feniletíl alcohol) C ₈ H ₁₀ O	
6	2-etil-1-hexanol C ₈ H ₁₈ O		17	4-metil-2-metoxifenol (4-metilguayacol) C ₈ H ₁₀ O ₂	
7	1-(2-furanil) etanona (2-furilmetil cetona) C ₆ H ₆ O ₂		18	(±)-5-butil-4-metildihidro-2(3H)-furanona (<i>cis</i> -whiskey-lactona) C ₉ H ₁₆ O ₂	
8	Benzaldehído C ₇ H ₆ O		19	Benzotiazol C ₇ H ₅ NS	
9	<i>trans</i> -2-nonenal C ₉ H ₁₆ O		20	2-metilfenol (<i>o</i> -cresol) C ₇ H ₈ O	
10	5-metil-2-furaldehído (5-metilfurfural) C ₆ H ₆ O ₂		21	1H-pirrol-2-carboxaldehído C ₅ H ₅ NO	
11	bencenacetaldehído (fenilacetaldehído) C ₈ H ₈ O		22	2-metoxi-4-etilfenol (4-etilguayacol) C ₉ H ₁₂ O ₂	

(Continuación) Tabla 1. Compuestos volátiles estudiados en la fracción volátil del vino.

Nº	Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula	Nº	Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula
23	4-metilfenol (<i>p</i> -cresol) C ₇ H ₈ O		32	5-hidroximetil-2-furaldehído C ₆ H ₆ O ₃	
24	3-metilfenol (<i>m</i> -cresol) C ₇ H ₈ O		33	4-ailil-2,6-dimetoxifenol (4-ailisiringol) C ₁₁ H ₁₄ O ₃	
25	2-metoxi-4-propilfenol (4-propilguayacol) C ₁₀ H ₁₄ O ₂		34	4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) C ₈ H ₈ O ₃	
26	4-etilfenol C ₈ H ₁₀ O		35	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) etanona (acetovanillona) C ₉ H ₁₀ O ₃	
27	2-metoxi-4-(2propenil)-fenol (eugenol) C ₁₀ H ₁₂ O ₂		36	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propanona (guayacilacetona) C ₁₀ H ₁₂ O ₃	
28	2-metoxi-4-vinilfenol (4-vinilguayacol) C ₉ H ₁₀ O ₂		37	3,5-dimetoxi- -4-hidroxibenzaldehído (siringaldehído) C ₉ H ₁₀ O ₄	
29	2,6-dimetoxifenol (siringol) C ₈ H ₁₀ O ₃		38	3',5'-dimetoxi- -4'-hidroxiacetofenona (acetosiringona) C ₁₀ H ₁₂ O ₄	
30	4-metil-2,6-dimetoxifenol (4-metilsiringol) C ₉ H ₁₂ O ₃		39	3,4,5-trimetoxifenol (antiarol) C ₉ H ₁₂ O ₄	
31	2-metoxi-4-(1propenil)-fenol (cis + trans) (isoeugenol (cis+trans)) C ₁₀ H ₁₂ O ₂		40	4-hidroxi-3-metoxicinamalaldehído (coniferil aldehído) C ₁₀ H ₁₀ O ₃	

4.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

4.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL

- Equipo GC-MS 7890A (**Figura 1**, Capítulo III) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU).
- Columna capilar ZB-WAX (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de alta polaridad y relleno de polietilenglicol, de Phenomenex (Torrance, CA, EEUU).
- Balanza analítica de precisión KERN ABT 220-5DM (Balingen, Alemania).
- Baño de ultrasonidos Ultrasons de JP Selecta S.A. (Barcelona, España).
- Colector de vacío para extracción en fase sólida VacMaster (Hengoes, Reino Unido) equipado con bomba de vacío Vacuubrand (Wertheim, Alemania).
- Cartuchos para extracción en fase sólida Strata-X, 33 μm, relleno polimérico de 200 mg/ 6 mL suministrados por Phenomenex.
- Estufa con un intervalo de temperaturas de trabajo entre 50 y 300 °C, Heraeus (Madrid, España).
- Micropipetas de Eppendorf (Hamburg, Alemania).
- Material de uso general de laboratorio.

4.3.2. REACTIVOS Y PATRONES

- Helio calidad BIP de Carburos Metálicos (Barcelona, España).
- Diclorometano y metanol de calidad Pestiscan, suministrado por Labscan (Dublín, Irlanda).
- Etanol absoluto PA de Panreac (Barcelona, España).
- Agua ultrapura obtenida mediante los equipos Elix-5 y Compact Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).
- Patrones puros e individuales de los 40 compuestos volátiles de tipo alcohólico, carbonílico, derivados fenólicos y furánicos, aparecen detallados en la **Tabla 1**. Todos ellos de calidad analítica, de Sigma-Aldrich, Fluka y Supelco (Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, MO, EEUU).
- Patrón puro de 2-octanol (patrón interno) de Sigma-Aldrich.
- 2 muestras de referencia utilizadas como blanco y preparadas en una bodega experimental, bajo la supervisión de investigadores de la Escuela de Ingenierías Agrarias de Palencia.
 - ◆ Vino sintético con una composición etanol/agua 12% (v/v) y 3.5 g/L de ácido tartárico para ajustar el pH.

- ◆ Vino de bodega experimental no sometido a procesos de envejecimiento en barrica.

4.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Los patrones puros fueron utilizados para preparar disoluciones madre de 10 mg/mL de cada analito en etanol, que fueron almacenadas a -18°C. A partir de ellas, mensualmente, por dilución con diclorometano se preparó una disolución conteniendo 100 mg/L de cada uno de los compuestos volátiles (disolución de trabajo), que se almacenaba en refrigeración a +4°C.

Para optimizar los parámetros del tratamiento de muestra y para preparar las dos líneas de calibrado, en vino experimental y vino sintético, se utilizaron una serie de disoluciones estándar de concentraciones entre 0.05 y 10 mg/L de cada volátil, partiendo de la disolución de trabajo y por sucesivas diluciones con diclorometano. En el caso de los compuestos volátiles que aparecían en mayores concentraciones en la matriz de vino, se añadieron puntos superiores en las líneas de calibrado, llegando hasta los 25 y 50 mg/L. Todas estas disoluciones fueron almacenadas en refrigeración a +4°C.

El patrón interno de 2-octanol se preparó a partir de una disolución madre de 1000 mg/L en etanol. Su disolución de trabajo de 10 mg/L se preparó, también mensualmente, por dilución con diclorometano, almacenándose a -18°C y +4°C respectivamente.

4.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

4.5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El primer paso para el análisis de los compuestos volátiles objeto de estudio consistió en establecer las condiciones cromatográficas que permitieran la separación y cuantificación de los analitos.

A partir de la bibliografía consultada⁷, se realizaron pruebas variando principalmente el programa de temperatura del horno cromatográfico, estableciendo finalmente las siguientes condiciones de trabajo:

- ✓ Gas portador: He, 1.1 mL/min.
- ✓ Volumen de inyección: 1 µL.

- ✓ Temperatura del inyector: 230 °C.
- ✓ Inyección en modo *Pulsed Splitless* (sin división de flujo y con pulso de presión).
- ✓ Programa de temperatura del horno:

	Pendiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Inicialmente</i>		45	1.5
<i>Rampa 1</i>	10	100	0
<i>Rampa 2</i>	7.5	250	25

- ✓ Temperatura de la interfase: 250 °C.
- ✓ Temperatura de la fuente de iones: 240 °C.
- ✓ Temperatura del cuádruplo: 180 °C.
- ✓ Registro de espectros de masas en modo SIM.

4.5.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

La identificación de los analitos se llevó a cabo mediante el análisis de los patrones individuales en las mismas condiciones cromatográficas. Para cada uno de los analitos se obtuvo su tiempo de retención y su espectro de masas mediante inyección en modo SCAN, utilizando la librería de espectros *Wiley 7N*. A partir de ellos se seleccionaron tanto el ión mayoritario (T) para la cuantificación como dos iones de confirmación (Q_1 , Q_2), para poder trabajar posteriormente en modo SIM.

En la **Tabla 2** aparecen detallados todos los valores que caracterizan a cada uno de los volátiles estudiados. A modo de ejemplo la **Figura 5** muestra el cromatograma de iones totales en modo SIM obtenido para la mezcla de los 40 compuestos volátiles de interés en concentraciones de 10 mg/L.

Tabla 2. Lista de analitos estudiados con sus respectivos tiempos de retención (t_r), iones mayoritarios (T) e iones de confirmación (Q_1 , Q_2) con sus porcentajes de abundancia (% Q_1 , % Q_2).

Nº	Compuestos volátiles	t_r (min)	T	Q_1	Q_2	% Q_1	% Q_2
1	1-hexanal	8.67	56.0	44.0	82.0	97.0	24.0
2	etilbenceno	9.34	91.0	106.1	77.0	32.0	8.0
3	2-pentilfurano	10.87	81.0	82.0	138.0	24.0	21.0
4	1-hexanol	12.58	56.0	69.0	84.0	34.0	7.0
5	2-furaldehído	14.6	96.0	95.0	67.0	98.0	7.0
6	2-etil-1-hexanol	14.79	57.0	83.1	98.0	24.0	8.0
7	2-furilmetil cetona	15.32	95.0	110.0	43.0	42.0	13.0
8	benzaldehído	15.76	106.0	105.0	77.0	96.0	93.0
9	trans-2-nonenal	15.84	41.1	83.0	111.0	79.0	12.0
10	5-metil-2-furaldehído	16.49	110.0	109.0	53.0	90.0	46.0
11	fenilacetaldehído	17.57	91.0	120.0	65.0	20.0	18.0
12	acetofenona	17.73	105.0	77.0	120.0	71.0	34.0
13	guayacol	20.62	109.0	124.0	81.0	81.0	63.0
14	alcohol bencílico	20.78	79.0	108.0	107.0	87.0	63.0
15	trans-whiskey-lactona	21.26	99.0	87.0	71.0	17.0	26.0
16	feniletil alcohol	21.34	91.0	92.0	122.0	56.0	27.0
17	4-metilguayacol	21.97	138.0	123.0	95.1	92.0	31.0
18	cis-whiskey-lactona	22.18	99.0	87.0	71.0	17.0	26.0
19	benzotiazol	22.21	135.0	108.0	91.0	32.0	7.0
20	o-cresol	22.46	108.0	107.0	90.0	92.0	24.0
21	1H-pirrol-2-carboxaldehído	22.89	95.0	94.0	66.0	61.0	44.0
22	4-etilguayacol	22.95	137.0	152.0	122.0	40.0	11.0
23	p-cresol	23.51	107.0	108.0	77.0	80.0	25.0
24	m-cresol	23.62	108.0	107.0	79.1	98.0	32.0
25	4-propilguayacol	23.97	137.0	166.0	122.0	25.0	10.0
26	4-etilfenol	24.69	107.0	122.1	77.0	33.0	16.0
27	eugenol	24.7	164.1	149.0	103.0	32.0	28.0
28	4-vinilguayacol	25.06	150.0	135.0	107.0	80.0	32.0
29	siringol	25.85	154.0	139.0	111.0	46.0	26.0
30	4-metilsiringol	26.84	168.0	153.0	125.0	48.0	29.0
31	isoeugenol (cis + trans)	26.92	164.0	149.0	103.0	34.0	25.0
32	5-hidroximetil-2-furaldehído	28.62	97.0	126.0	41.0	72.0	64.0
33	4-alilsiringol	29.18	194.0	179.0	167.0	13.0	11.0
34	vainillina	29.88	151.0	152.0	123.0	91.0	16.0
35	acetovanillona	30.81	151.0	166.1	123.0	49.0	23.0
36	guayacilacetona	31.04	137.0	180.0	122.0	22.0	16.0
37	siringaldehído	37.13	182.0	181.0	167.0	60.0	11.0
38	acetosiringona	38.28	181.0	196.0	153.0	52.0	11.0
39	antiarol	39.78	169.0	184.0	141.0	63.0	47.0
40	coniferil aldehído	43.61	178.0	177.0	135.0	30.0	20.0

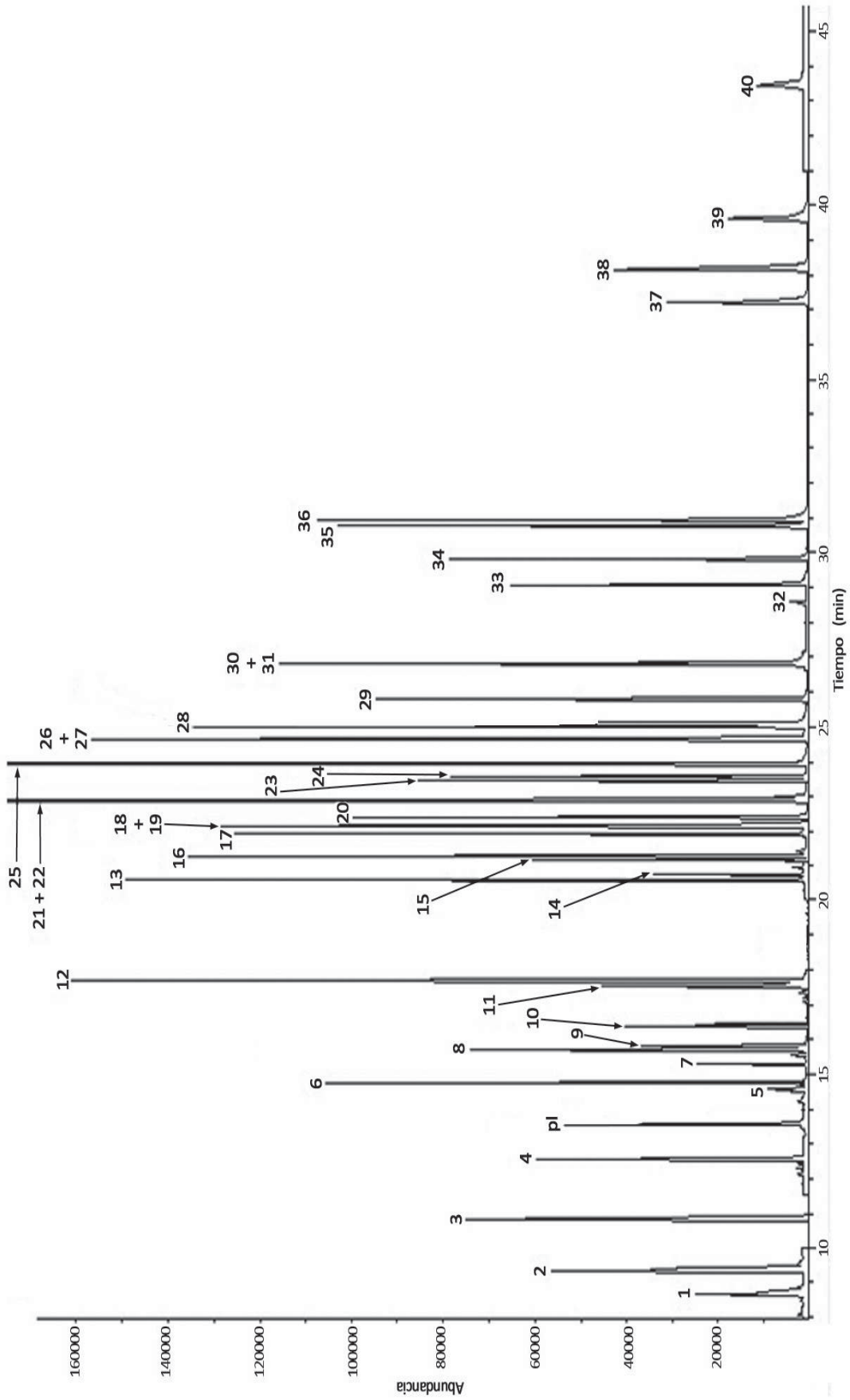


Figura 5. Cromatograma en modo SIM de una mezcla de patrones de los 40 compuestos volátiles en diclorometano en una concentración de 10 mg/L y 2-octanol como patrón interno (pl).

4.6. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS

Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con el software *Statgraphics Centurión XVI* versión 16.1.03 (Statpoint Technologies; Warrenton, VA, EEUU) y el programa *IBM SPSS Statistics* versión 20 (Statistical Package for the Social Sciences; Armonk, NY, EEUU).

En el tratamiento estadístico realizado con los datos obtenidos se aplicaron diseños de experimentos a diversos parámetros del tratamiento de muestra y, en cuanto a estadística descriptiva, ANOVA uni y multifactorial, análisis en componentes principales y análisis clúster, para obtener una visión global de los datos. Por último, mediante herramientas de estadística predictiva, se realizaron análisis discriminantes.

4.7. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El tratamiento de muestra llevado a cabo consistió básicamente en una etapa de extracción en fase sólida, seleccionándose cartuchos poliméricos de fase reversa Strata-X, con una capacidad de 200mg/6mL, los cuales habían dado buenos resultados para el análisis de compuestos volátiles en este mismo tipo de matriz.

Para establecer las condiciones finales del tratamiento de muestra, se pensó en el diseño de experimentos. De esta forma, se estudiaron simultáneamente los efectos de todos los factores de interés, realizando la experimentación de forma eficaz.

4.7.1. CRIBADO DE FACTORES

El primer paso en el desarrollo del tratamiento de muestra consistió en el estudio de cada uno de los factores que pudieran influir en la eficacia de la extracción en fase sólida, a través de un cribado de factores. Para ello, se seleccionaron seis factores considerados en principio importantes: volumen de muestra (V_{muestra}), volumen total al que se diluía la muestra con agua ultrapura (V_{total}), tiempo de secado de los cartuchos (t_{secado}), porcentaje de metanol en agua para la disolución empleada en la etapa de lavado (%MeOH), así como el volumen de disolución de lavado (V_{lavado}) y el volumen de diclorometano empleado en la elución ($V_{\text{elución}}$). En la **Figura 6** se muestra el esquema de la extracción en fase sólida con las etapas correspondientes y los factores a estudiar.

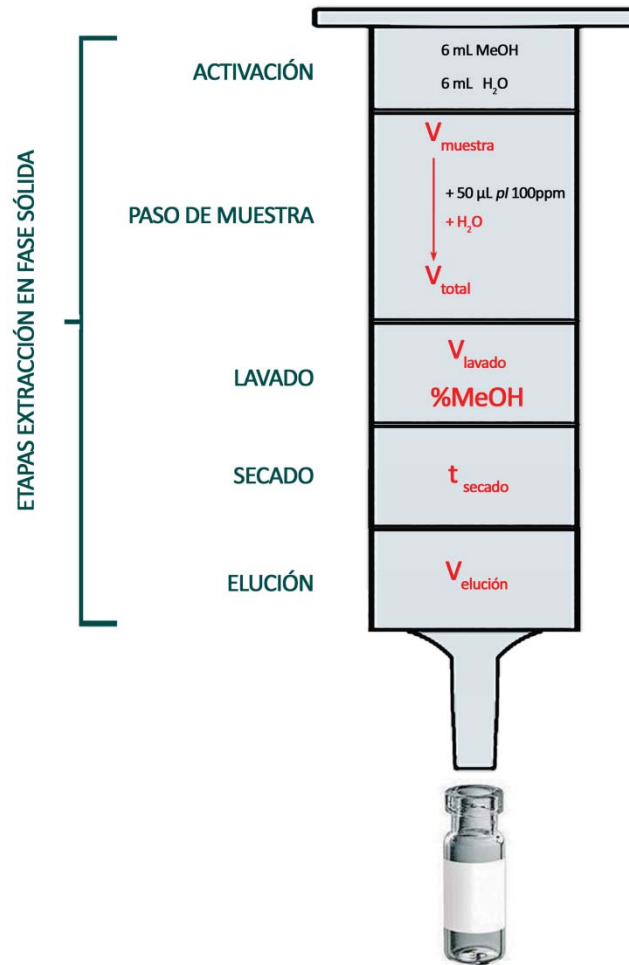


Figura 6. Esquema del tratamiento de muestra por extracción en fase sólida.
 Marcados en rojo los factores a estudiar mediante un diseño de cribado.

Los factores elegidos para realizar el cribado y sus respectivos intervalos de experimentación se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Factores considerados en el cribado e intervalos de experimentación.

Factor	Unidades	Nivel bajo	Nivel alto
A: V_{muestra}	mL	10	25
B: V_{total}	mL	50	100
C: t_{secado}	min	5	30
D: $V_{\text{elución}}$	mL	2	6
E: %MeOH	%	0	20
F: V_{lavado}	mL	1	4

Para llevar a cabo el cribado de factores se eligió un diseño factorial fraccional de modo que únicamente se evaluaron los efectos principales y las interacciones entre factores de primer orden. Todo ello mediante un total de 16 experimentos, los cuales se establecieron a partir de la matriz de experiencias desarrollada por el propio programa estadístico (**Tabla 4**).

Tabla 4. Matriz de experiencias en un diseño factorial fraccional con 6 factores.

Nº exp	V_{muestra} (mL)	V_{total} (mL)	t_{secado} (min)	V_{elución} (mL)	%MeOH	V_{lavado} (mL)
1	25	100	30	2	20	1
2	10	100	30	2	0	1
3	10	50	30	6	20	1
4	10	50	5	6	0	4
5	25	50	30	2	0	4
6	10	50	5	2	0	1
7	10	100	5	6	20	1
8	10	100	5	2	20	4
9	10	50	30	2	20	4
10	25	50	5	2	20	1
11	25	50	5	6	20	4
12	25	100	5	6	0	1
13	10	100	30	6	0	4
14	25	100	5	2	0	4
15	25	50	30	6	0	1
16	25	100	30	6	20	4

Para el análisis de resultados se seleccionaron los cinco compuestos volátiles siguientes: 2-furilmetil cetona, 1H-pirrol-2-carboxaldehido, 4-etilguayacol, 4-etilfenol y guayacilacetona. Se trataba de cinco compuestos volátiles con grupos funcionales y estructuras representativas del conjunto de analitos estudiados en este trabajo, además de comprobarse en ensayos previos que, en principio, eran volátiles que no se encontraban presentes en la matriz tomada como referencia.

Como vino de referencia se tomó un vino de la bodega experimental no sometido a tratamiento con madera (no envejecido). De cada uno de los compuestos anteriormente citados se adicionaron cantidades hasta tener una concentración de 200 µg/L en el vino de referencia. Finalmente, como variable respuesta se seleccionó la altura de pico para el ión principal en el cromatograma obtenido en modo SIM.

Una vez terminada la experimentación los resultados se evaluaron en función de los diagramas de pareto obtenidos para cada uno de los analitos estudiados. La **Figura 7** muestra dos diagramas de pareto obtenidos para los volátiles (a) 2-furilmetil cetona y (b) 4-etilguayacol.

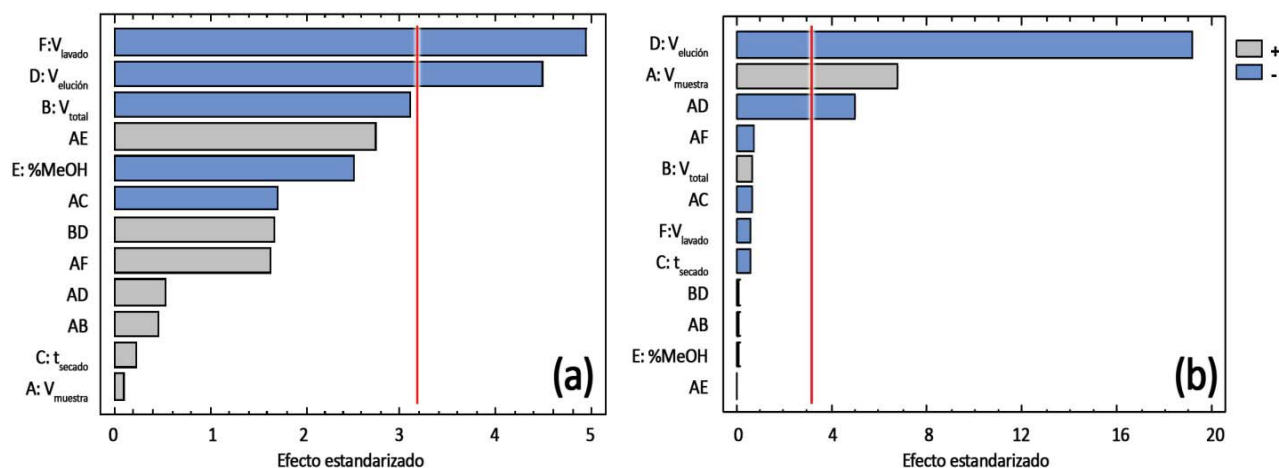


Figura 7. Diagramas de pareto para dos compuestos volátiles: (a) 2-furilmetil cetona y (b) 4-etilguayacol.

Como se puede observar en la **Figura 7a** los factores que provocaban una influencia significativa en la altura de pico para la 2-furilmetil cetona fueron el volumen de lavado así como el volumen de elución, concretamente en sentido negativo, es decir que al aumentar el volumen de lavado disminuía la altura de pico, por tanto, se perdía analito en la etapa de lavado.

Para el caso del 4-etilguayacol, tal como se aprecia en la **Figura 7b** la etapa de lavado ya no tiene una influencia significativa como en el caso de la 2-furilmetil cetona, sin embargo, el volumen de muestra, el volumen de elución, y la combinación de ambos factores (interacción AD) provocaba una influencia significativa para este analito.

De la misma forma se analizaron los diagramas de pareto del resto de analitos elegidos para el cribado. Se concluyó que la etapa de lavado tan sólo provocaba efectos negativos ya que algunos compuestos acababan eluyendo, provocando por tanto, una pérdida de eficacia. Por lo que se eliminó la etapa de lavado de la extracción en fase sólida, quedando descartados dos factores: el volumen de lavado y el porcentaje de metanol. Además, se observó que el tiempo

de secado tampoco resultaba influyente, así que se fijó un valor intermedio del intervalo estudiado (15 min) como parámetro final en el tratamiento de muestra. Se optó por este tiempo para estar seguros de que el cartucho se secaba por completo pero sin alargar demasiado el tratamiento de muestra, evitando la introducción de pequeñas proporciones de agua en la columna.

Por otro lado, se comprobó que los factores que resultaron significativos para la mayoría de los analitos fueron el **volumen de muestra**, el **volumen total** y el **volumen de elución**. Por tanto, fueron elegidos estos factores para el siguiente diseño, es decir, para su optimización en el tratamiento de muestra.

4.7.2. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE SUPERFICIES DE RESPUESTA

Una vez seleccionados los tres factores que mayor número de veces presentaban influencia significativa en los analitos estudiados y, para la búsqueda de sus mejores condiciones en la extracción en fase sólida, se realizó otro diseño de experimentos. En este caso, se trataba de un diseño central compuesto (CCD) 3^3 con 3 puntos centrales. La matriz de experiencias llevada a cabo para este diseño central compuesto se refleja en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Matriz de 30 experiencias para un diseño central compuesto con 3 factores y 3 puntos centrales.

Nº exp	V _{elución} (mL)	V _{muestra} (mL)	V _{total} (mL)	Nº exp	V _{elución} (mL)	V _{muestra} (mL)	V _{total} (mL)
1	1.0	10.0	100	16	4.0	10.0	75
2	4.0	10.0	50	17	2.5	17.5	100
3	2.5	10.0	75	18	1.0	25.0	50
4	2.5	17.5	75	19	2.5	17.5	75
5	2.5	10.0	100	20	4.0	25.0	50
6	4.0	17.5	75	21	1.0	25.0	100
7	1.0	17.5	75	22	1.0	10.0	50
8	4.0	10.0	100	23	1.0	25.0	75
9	2.5	25.0	50	24	4.0	25.0	100
10	1.0	17.5	100	25	2.5	17.5	75
11	4.0	17.5	100	26	2.5	17.5	75
12	2.5	17.5	50	27	1.0	17.5	50
13	2.5	25.0	75	28	1.0	10.0	75
14	4.0	25.0	75	29	2.5	25.0	100
15	4.0	17.5	50	30	2.5	10.0	50

Después de realizar las 30 experiencias, los resultados de los mismos cinco analitos evaluados en el diseño de cribado: 2-furilmetil cetona, 1H-pirrol-2-carboxaldehido, 4-etilguayacol, 4-etilfenol y guayacilacetona; se evaluaron igualmente en función de los diagramas de pareto obtenidos para cada uno de los cinco analitos estudiados.

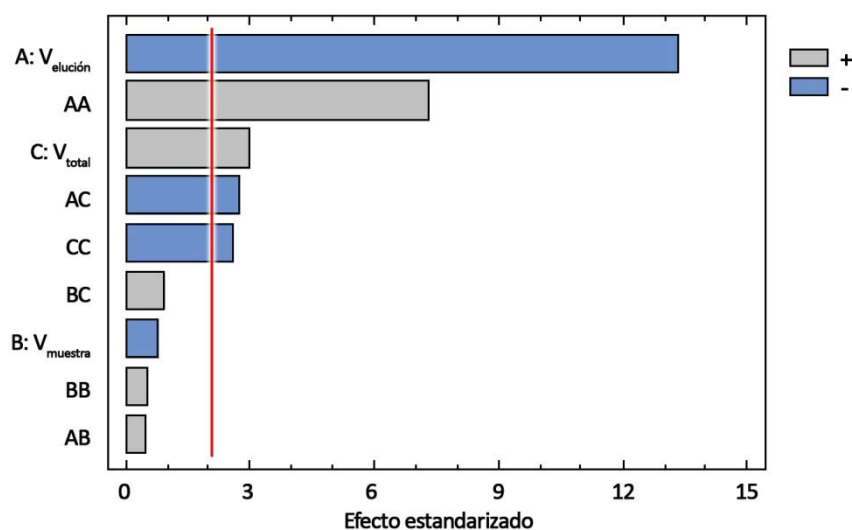


Figura 8. Diagrama de pareto para el analito 4-etilguayacol.

En la **Figura 8** se observa el diagrama de pareto para el 4-etilguayacol, obtenido a partir del diseño central compuesto. Como puede apreciarse, las variables significativas fueron el volumen de elución y el volumen total, tanto individualmente como su producto o interacción de primer orden (AC), además de ambos factores al cuadrado (AA, CC). Lo mismo pudo deducirse de los p-valores ($p\text{-valor} < 0.05$) de esos factores marcados con un asterisco en la tabla del ANOVA para este analito (**Tabla 6**).

Tabla 6. Tabla del ANOVA del ajuste llevado a cabo para el 4-etilguayacol.

Fuente	Suma de cuadrados	gdl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A: $V_{\text{elución}}$	4.55E+08	1	4.55E+08	2449.23	0.000*
B: V_{muestra}	1.47E+06	1	1.47E+06	7.89	0.067
C: V_{total}	2.26E+07	1	2.26E+07	121.65	0.002*
AA	1.37E+08	1	1.37E+08	734.64	0.001*
AB	606825	1	606825	3.27	0.168
AC	1.88E+07	1	1.88E+07	101.25	0.002*
BB	731780	1	731780	3.94	0.141
BC	2.14E+06	1	2.14E+06	11.51	0.053
CC	1.71E+07	1	1.71E+07	92.04	0.002*
Falta de ajuste	2.69E+07	17	1.58E+06	8.52	0.078
Error puro	557550	3	185850		
Total (corr.)	7.00E+08	29			

*: Diferencias significativas al 95% de probabilidad (p-valor < 0.05).

gdl: grados de libertad

R² = 92.67 %

R² (ajustada por gdl) = 89.37 %

Error estándar del est. = 431.10

Error absoluto medio = 1000.26

Estadístico Durbin-Watson = 2.3333 (P=0.8541)

Auto-correlación residual de Lag 1 = -0.2131

A partir de la **Tabla 6**, además de los factores y las combinaciones que resultaron significativas, se pudo concluir que los datos se ajustaban al modelo construido para esta variable, ya que no existía falta de ajuste (**p-valor>0.05**). Asimismo, el modelo así ajustado explicaba un **92.67%** de la variabilidad de los datos.

De la misma forma se interpretaron los resultados para el resto de analitos, observándose que en todos los casos no se producía falta de ajuste, de modo que los modelos ajustados explicaban significativamente los datos y además los porcentajes de varianza explicados fueron superiores al **85%**.

Además, para cada una de las cinco variables, se interpretaron las variaciones en la función respuesta para cada uno de los factores ($V_{\text{elución}}$, V_{muestra} y V_{total}). La **Figura 9** muestra, a modo de ejemplo, el gráfico de efectos principales del compuesto volátil guayacilacetona.

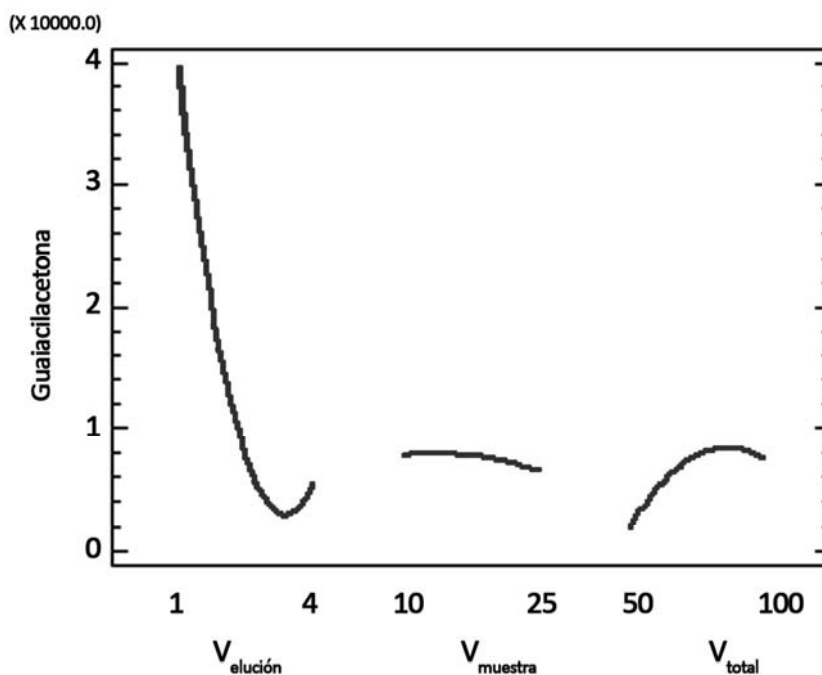


Figura 9. Gráfico de efectos principales para la guayacilacetona.

A partir de la **Figura 9** se puede interpretar el efecto de los factores significativos. Por una parte, cuanto mayor era el volumen de elución menor señal se obtenía para el analito, posiblemente debido a que se conseguía la elución de casi la totalidad del compuesto en el primer mililitro de diclorometano. En el caso del volumen de muestra, se pudo concluir que un aumento del volumen de muestra no daba lugar a un mayor efecto matriz, es decir, que un aumento en la cantidad de muestra apenas daba lugar a variaciones en la señal del analito. Finalmente, se pudo apreciar que a medida que aumentaba el volumen total de la muestra diluida en agua ultrapura, era mayor la señal del analito, en este caso debido probablemente a una mejor retención de la guayacilacetona, hasta alcanzar un máximo, a partir del cual la señal para el analito disminuía de nuevo.

Después de llevar a cabo el análisis de los resultados obtenidos para cada una de las cinco variables elegidas en este apartado, el siguiente paso consistió en establecer las condiciones experimentales óptimas para los tres factores significativos. Se llevó a cabo mediante un diagrama de deseabilidad, donde la señal (altura de pico) se maximizaba para cada una de las variables respuesta. En la **Figura 10** se muestra la superficie de respuesta estimada para la deseabilidad.

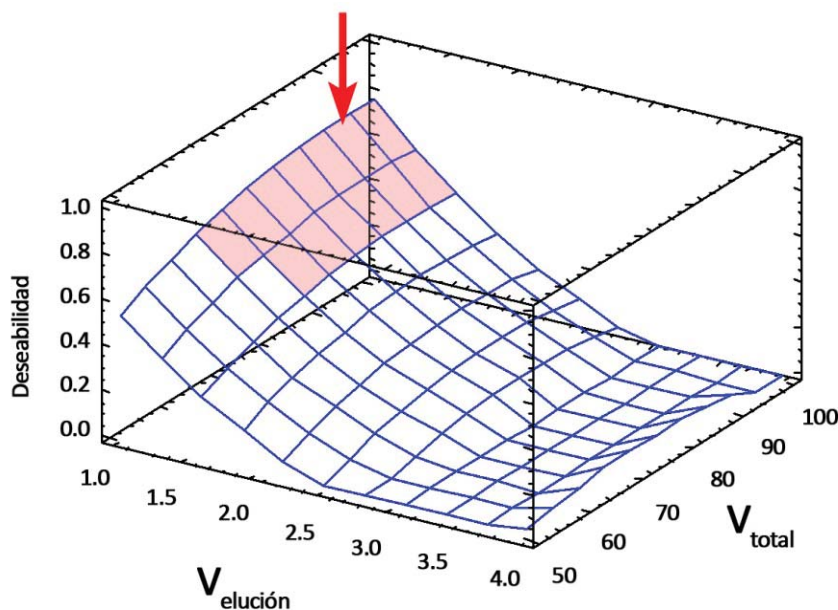


Figura 10. Superficie de respuesta para la función de deseabilidad estimada, en función de dos de los factores y fijando el valor del tercero: $V_{muestra}=10.0$ mL. Marcado el área y el valor de mayor deseabilidad.

Tal y como se aprecia en la **Figura 10** la deseabilidad decrece rápidamente según aumenta el volumen de elución, mientras que para el volumen total de muestra diluida en agua ultrapura, se observa cómo para valores bajos del factor volumen de elución, a partir de un valor en torno a los 90 mL los valores de deseabilidad ya no aumentan al seguir incrementando el valor del factor. Por tanto, este gráfico de deseabilidad justifica visualmente la zona donde se maximiza la señal, correspondiente a la combinación de valores de volumen de elución y volumen total óptimos.

A su vez, la **Tabla 7** especifica las condiciones óptimas de trabajo, obtenidas por el software estadístico empleado, según el criterio de maximización de respuestas múltiples. Cabe destacar que el valor experimental del volumen total de agua ultrapura utilizada para diluir la muestra fue 93 mL.

Tabla 7. Intervalo ensayado y condiciones óptimas de trabajo para la extracción en fase sólida de compuestos volátiles en vino en cartuchos Strata-X.

Factor	Nivel bajo	Nivel alto	Óptimo
$V_{elución}$	1.0	4.0	1.0
$V_{muestra}$	10.0	25.0	10.0
V_{total}	50.0	100.0	92.9

4.7.3. MÉTODO PROPUESTO

Teniendo en cuenta las conclusiones obtenidas en los apartados anteriores de cribado y optimización del proceso de extracción en fase sólida, se propuso el método para llevar a cabo el tratamiento de muestra mediante extracción en fase sólida.

La **Figura 11** muestra de forma esquemática el método propuesto, apareciendo en rojo los valores óptimos de los factores optimizados mediante respuestas múltiples. Se tomaron 10 mL de muestra de vino experimental, añadiendo 50 μL de 2-octanol de 100 mg/L como patrón interno (pl) y se diluyeron con agua desionizada hasta un volumen final de 93 mL. Esta muestra se pasó por un cartucho Strata-X de 200 mg/ 6 mL, previamente acondicionado con 6 mL de metanol y 6 mL de agua desionizada. Una vez pasada la muestra por el cartucho, éste se secó a vacío durante 15 min. Posteriormente, la muestra contenida en el cartucho se eluyó con 1 mL de diclorometano, recogiendo el extracto en un vial transparente de 2 mL, el cual fue encapsulado e inmediatamente analizado en el equipo GC-MS.

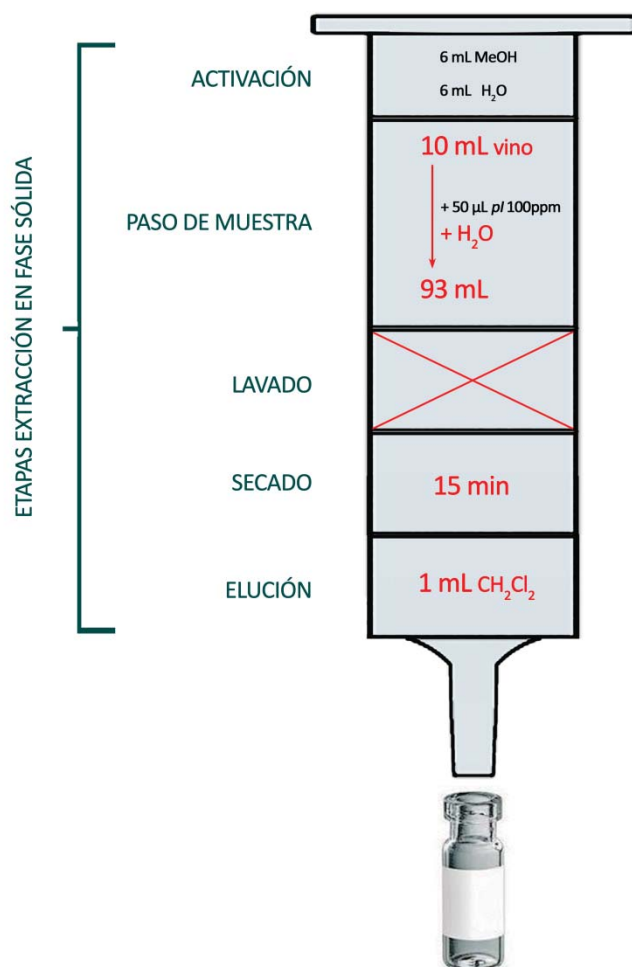


Figura 11. Esquema del método propuesto para el tratamiento de muestra por extracción en fase sólida.

Marcados en rojo los valores óptimos de los factores más influyentes sometidos a estudio.

4.8. CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de los 40 analitos se realizó por el procedimiento del patrón interno, útil para corregir las variaciones que ocurrían durante el método y el análisis instrumental. Como patrón interno se utilizó un compuesto volátil que no estaba presente en la matriz de vino, con una naturaleza similar a los analitos de estudio, que proporcionase un pico cromatográfico bien resuelto y cuya elución estuviera cerca de los analitos de interés pero sin interferir. Se eligió el volátil 2-octanol, añadiéndose 50 µL de una concentración de 100 mg/L a las muestras y realizándose las líneas de calibrado correspondientes en vino sintético y vino experimental.

4.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Una vez puesto a punto el método de análisis, el siguiente paso consistió en la validación del mismo. Para ello se tuvo en cuenta la guía EURACHEM³⁷, llevándose a cabo la validación en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, así como en términos de exactitud y precisión.

4.9.1. LINEALIDAD

En primer lugar, se realizó un ensayo en blanco del vino experimental tomado como referencia, evaluando qué analitos de todos los analizados se encontraban presentes y cuáles no. A partir de este ensayo previo se decidió llevar a cabo la calibración tanto en el vino de referencia o experimental como en el vino sintético (EtOH/H₂O 12% (v/v) con 3.5 g/L de ácido tartárico) considerado como una forma de emular la matriz hidro-alcohólica, aplicando todo el tratamiento de muestra propuesto.

En la **Tabla 8** se muestran los resultados correspondientes a los intervalos de calibración, así como los datos de la regresión para cada analito de interés (pendiente y R^2).

Tabla 8. Intervalos de calibración, parámetros de la regresión, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada analito en la matriz en la cual se realizó la calibración.

Nº	Compuesto volátil	Matriz calibrado	Intervalo calibración (mg/L)	Parámetros regresión		Límites (mg/L)	
				Pendiente	R ²	LOD	LOQ
1	1-hexanal	VS	0.005 – 0.25	1105.9	0.9985	0.002	0.005
2	etilbenceno	VS	0.005 – 0.25	9607.9	0.9920	0.001	0.003
3	2-pentilfurano	VS	0.005 – 0.25	5788.5	0.9972	0.001	0.003
4	1-hexanol	VS	0.25 – 25	3278.6	0.9966	0.001	0.003
5	2-furaldehído	VS	0.005 – 1	639.84	0.9995	0.002	0.005
6	2-etil-1-hexanol	VS	0.005 – 0.25	9685.8	0.9991	0.001	0.003
7	2-furilmetil cetona	VE	0.005 – 0.25	3513.9	0.9922	0.001	0.003
8	benzaldehído	VS	0.10 – 10	4172.1	0.9991	0.001	0.003
9	trans-2-nonenal	VS	0.005 – 1	1277.5	0.9946	0.002	0.005
10	5-metil-2-furaldehído	VS	0.005 – 5	2360.9	0.9996	0.001	0.003
11	fenilacetaldehído	VS	0.005 – 0.25	4481.5	0.9987	0.001	0.003
12	acetofenona	VS	0.001 – 0.25	12284	0.9983	0.0005	0.001
13	guayacol	VS	0.005 – 0.25	7456.6	0.9931	0.001	0.003
14	alcohol bencílico	VS	0.005 – 5	1248.9	0.9946	0.002	0.005
15	trans-whiskey-lactona	VS	0.025 – 5	814.97	0.9969	0.002	0.005
16	feniletil alcohol	VS	0.5 – 25	4333.9	0.9918	0.001	0.003
17	4-metilguayacol	VE	0.005 – 0.25	5192.9	0.9990	0.001	0.003
18	cis-whiskey-lactona	VS	0.005 – 5	3187.5	0.9996	0.001	0.003
19	benzotiazol	VE	0.005 – 0.25	8341.5	0.9995	0.0005	0.001
20	o-cresol	VE	0.005 – 0.25	6327.5	0.9980	0.001	0.003
21	1H-pirrol-2-carboxaldehído	VE	0.005 – 1	915.69	0.9996	0.002	0.005
22	4-etilguayacol	VE	0.005 – 1	13818	0.9989	0.0005	0.001
23	p-cresol	VE	0.005 – 0.25	4832.7	0.9989	0.001	0.003
24	m-cresol	VE	0.001 – 0.25	4221.3	0.9991	0.0005	0.001
25	4-propilguayacol	VE	0.001 – 0.25	25141	0.9996	0.0005	0.001
26	4-etilfenol	VE	0.005 – 10	10737	0.9995	0.0005	0.001
27	eugenol	VE	0.005 – 0.25	5744.2	0.9998	0.001	0.003
28	4-vinilguayacol	VE	0.005 – 0.25	3635.1	0.9902	0.001	0.003
29	siringol	VE	0.005 – 1	5471.2	0.9999	0.001	0.003
30	4-metilsiringol	VS	0.010 – 1	6546.4	0.9998	0.001	0.003
31	isoeugenol (cis+trans)	VE	0.005 – 0.25	4302.3	0.9965	0.001	0.003
32	5-hidroximetil-2-furaldehído	VE	0.10 – 2	131.61	0.9971	0.05	0.1
33	4-alilsiringol	VS	0.005 – 0.50	2498.7	0.9982	0.001	0.003
34	vainillina	VS	0.005 – 5	3656.0	0.9996	0.001	0.003
35	acetovanillona	VS	0.005 – 0.50	5640.4	0.9932	0.001	0.003
36	guayacilacetona	VS	0.005 – 1	8043.5	0.9998	0.001	0.003
37	siringaldehído	VE	0.05 – 5	1820.5	0.9986	0.002	0.005
38	acetosiringona	VS	0.005 – 1	2988.8	0.9944	0.001	0.003
39	antiarol	VS	0.05 – 5	909.02	0.9999	0.005	0.01
40	coniferil aldehído	VE	0.005 – 0.25	554.56	0.9962	0.002	0.005

VS: vino sintético.

VE: vino experimental.

Como se puede observar en la **Tabla 8** la calibración se realizó únicamente en el vino experimental (VE) cuando se había comprobado previamente mediante un análisis en blanco que el analito no se encontraba en la propia matriz, pudiéndose realizar por tanto una calibración matriz-patrón. En aquellos casos en los que el volátil se encontraba presente en la matriz la calibración se realizó en el vino sintético (VS).

Los intervalos de linealidad en la mayoría de los casos comprendían entre los 5 y los 250 µg/L, aunque en el caso del feniletil alcohol el límite superior en el intervalo lineal se elevó hasta los 25 mg/L, por ser un compuesto muy abundante en vinos, teniendo que diluir las muestras para poder cuantificarlo.

4.9.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La **Tabla 8** también muestra los límites de detección y cuantificación experimentales, calculados como las concentraciones equivalentes a una señal 3 y 10 veces la relación señal/ruido, respectivamente.

Los valores de los límites de detección abarcaban un intervalo entre 0.5 y 50 µg/L, independientemente de la línea de calibrado utilizada. A su vez, la mayoría de los límites de cuantificación englobaban valores entre 1 y 100 µg/L.

4.9.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN

La **Tabla 9** muestra los porcentajes de recuperación (% Rec) y sus desviaciones estándar relativas (% RSD) obtenidos para cada analito analizado a dos niveles de concentración en muestras: 0.01 y 0.1 mg/L. A través de estos valores, se calcularon la exactitud y precisión del método.

Para evaluar ambos parámetros se realizó por quintuplicado un análisis en blanco del vino experimental (VE) y sintético (VS) al que se había adicionado una cantidad conocida de patrón, sometiéndose el vino al tratamiento de muestra puesto a punto. Una vez realizada la cuantificación y calculados los porcentajes de recuperación como medida de la exactitud del método, se calcularon las desviaciones estándar relativas como medida de la precisión.

Tabla 9. Valores para la evaluación de la exactitud y la precisión del método a dos niveles de concentración (0.01 y 0.1 mg/L).

Nº	Compuesto volátil	Matriz calibrado	Exactitud y precisión			
			0.01 mg/L		0.1 mg/L	
			% Rec	% RSD	% Rec	% RSD
1	1-hexanal	VS	95.3	11.6	100.0	7.3
2	etilbenceno	VS	101.8	6.1	99.4	4.0
3	2-pentilfurano	VS	87.7	8.8	101.6	3.5
4	1-hexanol	VS	96.8 ^a	3.3	106.7 ^a	8.9
5	2-furaldehído	VS	96.9	4.4	96.4	6.9
6	2-etil-1-hexanol	VS	92.1	3.5	95.4	3.4
7	2-furilmetil cetona	VE	90.9	9.1	101.1	3.7
8	benzaldehído	VS	100.0 ^b	1.4	101.0 ^b	3.5
9	trans-2-nonenal	VS	108.9	4.6	107.0	4.9
10	5-metil-2-furaldehído	VS	96.2	9.2	97.4	4.3
11	fenilacetaldehído	VS	101.9	4.8	109.8	9.3
12	acetofenona	VS	97.1	2.7	100.8	3.3
13	guayacol	VS	111.1	4.5	101.7	4.6
14	alcohol bencílico	VS	95.7	3.9	99.3	5.8
15	trans-whiskey-lactona	VS	95.9	10.9	102.9	10.5
16	feniletíl alcohol	VS	110.4 ^a	9.4	95.8 ^a	2.7
17	4-metilguayacol	VE	101.3	4.6	105.1	2.6
18	cis-whiskey-lactona	VS	92.6	7.9	99.7	2.1
19	benzotiazol	VE	104.9	5.8	103.9	2.0
20	o-cresol	VE	98.3	6.0	114.4	4.5
21	1H-pirrol-2-carboxaldehído	VE	95.4	8.5	113.1	6.2
22	4-etilguayacol	VE	98.1	5.5	107.9	5.4
23	p-cresol	VE	96.9	6.1	103.5	5.8
24	m-cresol	VE	101.2	7.7	101.0	8.4
25	4-propilguayacol	VE	97.1	3.4	105.3	1.5
26	4-etilfenol	VE	93.0	6.7	101.8	1.6
27	eugenol	VE	99.2	5.3	103.8	7.3
28	4-vinilguayacol	VE	99.7	3.8	105.9	9.9
29	siringol	VE	98.3	5.6	98.9	6.9
30	4-metilsiringol	VS	95.5	8.2	117.7	5.2
31	isoeugenol (cis+trans)	VE	100.2	9.5	101.2	3.5
32	5-hidroximetil-2-furaldehído	VE	96.2^b	5.5	98.3^b	9.0
33	4-alilsiringol	VS	100.2	8.2	119.3	8.6
34	vainillina	VS	99.3	3.5	95.6	0.7
35	acetovanillona	VS	100.9	8.8	96.8	3.3
36	guayacilacetona	VS	91.1	6.3	104.6	3.4
37	siringaldehído	VE	102.4^b	4.2	102.3^b	3.1
38	acetosiringona	VS	93.7	11.8	100.8	10.5
39	antiarol	VS	97.7 ^b	4.9	109.6 ^b	12.7
40	coniferil aldehído	VE	72.7	18.3	99.2	10.0

^a: niveles de concentración 0.5 y 5 mg/L. ^b: niveles de concentración 0.1 y 1 mg/L.

%Rec: % recuperación. RSD: desviación estándar relativa del % de recuperación.

VS: vino sintético. VE: vino experimental.

Como se aprecia en la **Tabla 9**, la mayoría de porcentajes de recuperación se encontraban próximos al 100%. Concretamente, en ambos niveles de concentración, un 90% de los analitos presentaban valores entre el 90 y el 110%. A pesar de aparecer tres analitos con porcentajes de recuperación más alejados del 100%: 4-metilsiringol (117.7%) y 4-ailisiringol (119.3%) en el nivel de concentración de 0.1 mg/L, y coniferil aldehído (72.7%) en el nivel de concentración inferior, de 0.01 mg/L, sus límites de detección y cuantificación e intervalos de calibrado no destacaron del resto de analitos. De forma que los parámetros de la regresión permitían llevar a cabo una cuantificación de estos compuestos, a pesar de su menor recuperación en el tratamiento de muestra, lo cual, cuando se trata de análisis multicomponente, en ocasiones resulta inevitable.

Por tanto, los porcentajes de recuperación revelaron que las concentraciones calculadas mediante la calibración se ajustaban con bastante exactitud a la cantidad de patrón añadida, es decir que se pudo concluir que el método era exacto.

Con respecto a la repetibilidad como medida de la precisión del método, las desviaciones estándar relativas fueron inferiores al 10% en el 90% de los casos, en ambos niveles de concentración. El resto de porcentajes, excepto para uno de los % RSD del coniferil aldehído (18.3%), fueron superiores pero siempre por debajo de un 13%, con lo cual se pudo confirmar que el método además de exacto era preciso.

4.10. APLICACIÓN DEL MÉTODO

Las 35 muestras de vino analizadas aparecen enumeradas en la **Tabla 10**, pertenecen a la denominación de origen Ribera del Duero, de las cuales 20 fueron envejecidas de manera convencional en barrica de roble americano o francés, y 9 y 6 fueron sometidas a sistemas de envejecimiento con astillas y tablonos respectivamente, con el mismo tipo de madera que las envejecidas en barrica.

Tabla 10. Lista de muestras de vinos Ribera de Duero, especificando el sistema de envejecimiento utilizado y el origen de la madera de roble utilizada para ello.

Muestra	Sistema envejecimiento	Origen madera
1	Astillas	Americano
2	Astillas	Americano
3	Tablones	Americano
4	Tablones	Americano
5	Barrica	Americano
6	Barrica	Americano
7	Astillas	Americano
8	Tablones	Americano
9	Barrica	Americano
10	Astillas	Francés
11	Tablones	Francés
12	Barrica	Francés
13	Astillas	Francés
14	Astillas	Francés
15	Astillas	Francés
16	Barrica	Francés
17	Barrica	Francés
18	Astillas	Francés
19	Astillas	Francés
20	Tablones	Francés
21	Tablones	Francés
22	Barrica	Francés
23	Barrica	Francés
24	Barrica	Americano
25	Barrica	Americano
26	Barrica	Americano
27	Barrica	Americano
28	Barrica	Americano
29	Barrica	Americano
30	Barrica	Francés
31	Barrica	Francés
32	Barrica	Francés
33	Barrica	Francés
34	Barrica	Francés
35	Barrica	Francés

4.11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.11.1. DETERMINACIÓN DE VOLÁTILES EN MUESTRAS DE VINO

En la **Figura 12** se comparan dos cromatogramas obtenidos para dos muestras de vinos envejecidas en barrica y mediante tablonos, respectivamente.

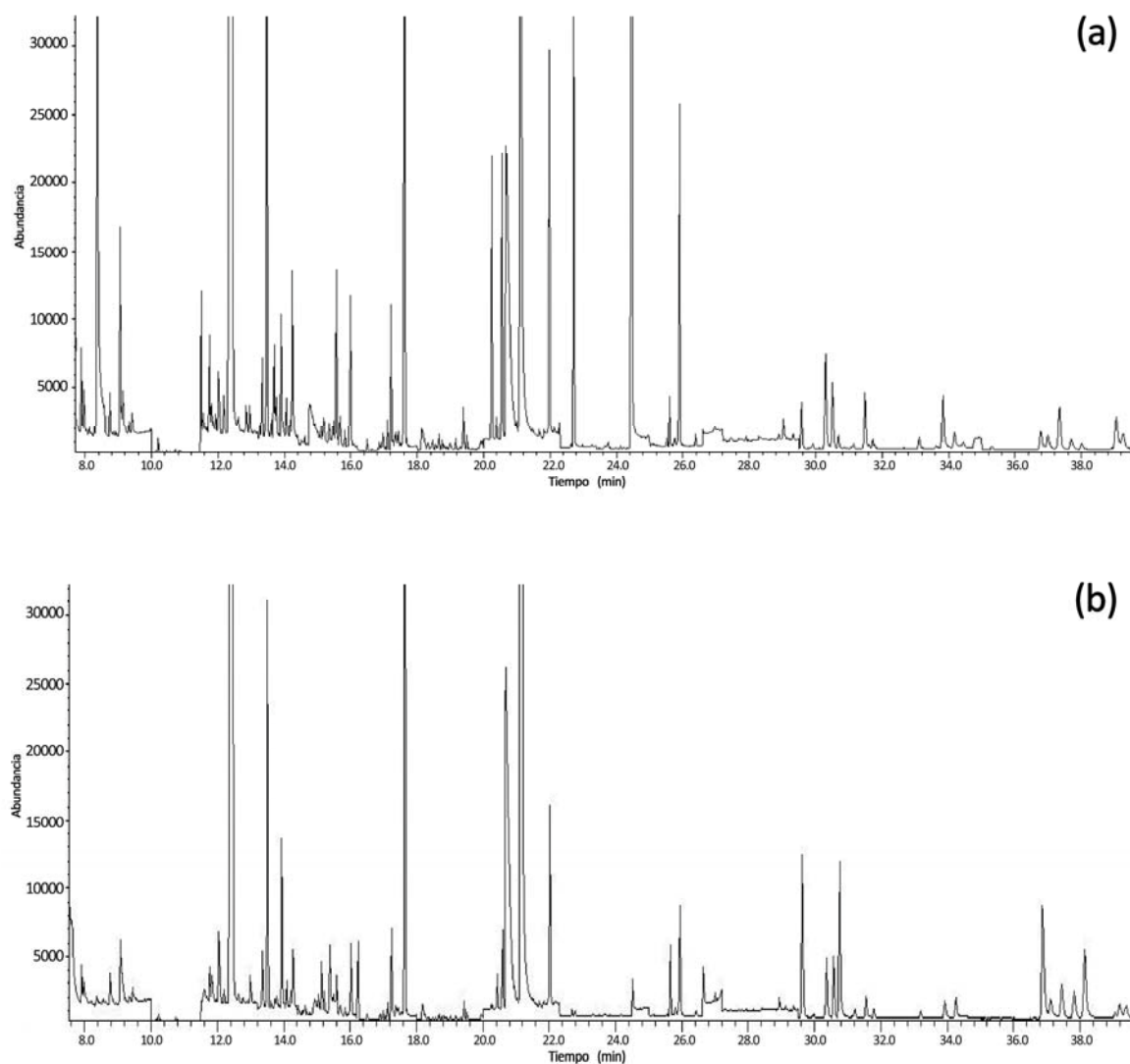


Figura 12. Cromatogramas de muestras de vino envejecidas en (a) barrica y (b) mediante un sistema acelerado con tablonos.

Como se puede apreciar mediante la comparación de la **Figura 12a** y **12b**, el perfil de compuestos es diferente para vinos envejecidos en barrica con respecto a vinos envejecidos mediante tablonos. Estas diferencias encontradas visualmente *a priori* pueden contrastarse mediante las medidas estadísticas descriptivas para los 40 compuestos volátiles, que se reflejan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Medidas estadísticas descriptivas del contenido de fracción volátil en vinos con astillas, barricas y tablonas como sistemas utilizados para el envejecimiento del vino.

Compuesto	Estadísticos descriptivos								
	Astillas			Barricas			Tablonas		
	Media (mg/L)	*IC (95%)		Media (mg/L)	IC (95%)		Media (mg/L)	IC (95%)	
	Inf.	Sup.		Inf.	Sup.		Inf.	Sup.	
1-hexanal	0.107	0.060	0.154	0.070	0.054	0.086	0.055	0.021	0.088
etilbenceno	0.053	0.039	0.066	0.035	0.030	0.041	0.032	0.027	0.036
2-pentilfurano	0.009	0.006	0.012	0.006	0.005	0.008	0.009	0.007	0.011
1-hexanol	14.3	11.9	16.8	11.5	10.3	12.8	14.0	10.0	18.0
2-furaldehído	0.207	0.028	0.386	0.256	0.142	0.370	0.368	0.008	0.728
2-etil-1-hexanol	0.022	0.009	0.034	0.010	0.007	0.013	0.007	0.000	0.014
2-furilmetilcetona	0.056	0.044	0.067	0.544	0.344	0.743	0.795	0.000	1.70
benzaldehído	0.193	0.133	0.253	0.140	0.106	0.174	0.178	0.123	0.232
trans-2-nonenal	0.355	0.263	0.447	0.238	0.184	0.293	0.341	0.169	0.513
5-metil-2-furaldehído	0.020	0.005	0.035	0.113	0.264	0.200	0.416	0.000	1.025
fenilacetaldehído	0.143	0.134	0.153	0.120	0.110	0.130	0.125	0.111	0.139
acetofenona	0.006	0.002	0.009	0.003	0.002	0.006	0.002	0.000	0.003
guayacol	0.072	0.053	0.091	0.072	0.054	0.089	0.103	0.042	0.163
alcohol bencílico	2.56	0.984	4.14	1.28	0.745	1.81	2.52	0.346	4.71
trans-whiskey-lactona	0.393	0.319	0.467	0.887	0.620	1.15	0.397	0.127	0.667
feniletíl alcohol	190	170	210	156	141	171	179	162	196
4-metilguayacol	0.083	0.039	0.127	0.039	0.020	0.059	0.080	0.000	0.162
cis-whiskey-lactona	1.51	0.371	2.64	2.65	1.63	3.67	3.19	0.735	5.65
benzotiazol	0.011	0.008	0.013	0.012	0.011	0.014	0.011	0.005	0.016
o-cresol	0.009	0.008	0.010	0.007	0.006	0.008	0.009	0.006	0.013
1H-pirrol-2-carboxaldehído	0.122	0.000	0.266	0.197	0.133	0.261	0.444	0.339	0.548
4-etilguayacol	0.243	0.000	0.615	0.123	0.000	0.292	0.794	0.146	1.44
p-cresol	0.012	0.011	0.013	0.011	0.010	0.012	0.013	0.009	0.018
m-cresol	0.002	0.000	0.003	0.002	0.001	0.003	0.004	0.002	0.006
4-propilguayacol	0.004	0.000	0.010	0.003	0.000	0.006	0.018	0.000	0.054
4-etilfenol	2.41	0.00	6.13	1.14	0.00	2.77	6.55	0.469	12.6
eugenol	0.059	0.031	0.087	0.140	0.103	0.177	0.137	0.031	0.242
4-vinilguayacol	0.014	0.010	0.018	0.010	0.008	0.012	0.016	0.013	0.019
siringol	0.561	0.479	0.643	0.504	0.414	0.594	0.537	0.357	0.717
4-metilsiringol	0.290	0.090	0.491	0.110	0.053	0.168	0.155	0.011	0.299
isoeugenol (cis+trans)	0.005	0.002	0.007	0.005	0.004	0.007	0.005	0.001	0.008
5-hidroximetil-2-furaldehído	0.357	0.294	0.420	0.311	0.274	0.347	0.401	0.296	0.506
4-alilsiringol	0.243	0.136	0.349	0.253	0.192	0.313	0.258	0.092	0.425
vainillina	0.855	0.376	1.33	0.686	0.450	0.923	0.847	0.218	1.476
acetovanillona	0.362	0.272	0.453	0.202	0.152	0.251	0.287	0.211	0.364
guayacilacetona	0.308	0.118	0.499	0.441	0.281	0.601	0.588	0.000	1.20
siringaldehído	1.96	0.470	3.45	1.069	0.644	1.49	1.43	0.195	2.66
acetosiringona	0.836	0.498	1.17	0.487	0.393	0.580	0.608	0.452	0.763
antiarol	0.431	0.210	0.653	0.319	0.221	0.417	0.429	0.000	0.897
coniferil aldehído	0.050	0.035	0.067	0.048	0.040	0.056	0.053	0.027	0.079

*IC: Intervalo de confianza de la media. Inf.: inferior. Sup.: superior.

La **Tabla 11** muestra que el compuesto mayoritario encontrado en los vinos, en cuanto al perfil aromático se refiere, fue el **feniletil alcohol**, compuesto característico producto del contacto del vino con madera, tratándose además del componente mayoritario en todas las muestras de vino independientemente del sistema de envejecimiento. El siguiente compuesto en cuanto a abundancia en los vinos analizados fue el **1-hexanol**, con concentraciones medias entre 11 y 15 mg/L.

Con una abundancia entre 1 y 6 mg/L se encontraron una serie de compuestos como alcohol bencílico, 4-etilfenol, cis-whiskey-lactona y siringaldehído. El resto de compuestos que formaban el perfil de volátiles de los vinos se encontraron en menores concentraciones, variando desde: por encima de los 100 µg/L como en el caso del 4-etilguayacol o la vainillina, hasta del orden de los 20 µg/L del p-cresol o el 4-vinilguayacol, todos ellos compuestos importantes en la caracterización del aroma de los vinos y que tienen casi todos su origen en los procesos de envejecimiento en contacto con la madera.

4.11.2. ANÁLISIS DE VARIANZA

Viendo las diferencias en cuanto al perfil que presentaban *a priori* los vinos analizados en función de su sistema de envejecimiento, se realizó un estudio de las posibles diferencias entre los vinos analizados, según el sistema de envejecimiento o el origen de la madera de roble utilizados para dicho proceso.

Para ello, se realizaron ANOVAS de un factor en cada una de las variables. Además, se llevó a cabo un ANOVA de factores combinados para estudiar las posibles diferencias en el contenido de compuestos volátiles, en función de ambos factores, es decir, de la combinación entre el sistema de envejecimiento (barrica o sistemas acelerados: astillas y tablones) y el origen de la madera de roble usada para el mismo (francés o americano).

En la **Tabla 12** se muestran los resultados obtenidos en los ANOVAS realizados para cada variable, marcando en color rojo los valores de las variables que presentaban diferencias significativas con una confianza del 95% (p -valor < 0.05).

Tabla 12. Significación (p-valor) para cada variable estudiada en función del sistema de envejecimiento, el origen de la madera y la interacción entre ambos factores.

Variable	Factor		
	Sistema envejecimiento	Origen madera	Sistema * Origen
1-hexanal	0.045*	0.002*	0.001*
etilbenceno	0.003*	0.026*	0.007*
2-pentilfurano	0.071	0.727	0.803
1-hexanol	0.048*	0.724	0.967
2-furaldehído	0.499	0.906	0.865
2-etil-1-hexanol	0.008*	0.275	0.001*
2-furilmetilcetona	0.120	0.584	0.563
benzaldehído	0.164	0.320	0.727
trans-2-nonenal	0.049*	0.869	0.995
5-metil-2-furaldehído	0.026*	0.914	0.683
fenilacetaldehído	0.014*	0.892	0.568
acetofenona	0.064	0.029*	0.232
guayacol	0.224	0.340	0.424
alcohol bencílico	0.078	0.083	0.098
trans-whiskey-lactona	0.012*	0.595	0.860
feniletil alcohol	0.014*	0.920	0.761
4-metilguayacol	0.075	0.740	0.523
cis-whiskey-lactona	0.253	0.231	0.772
benzotiazol	0.468	0.661	0.830
o-cresol	0.026*	0.500	0.943
1H-pirrol-2-carboxaldehído	0.001*	0.678	0.751
4-etilguayacol	0.010*	0.739	0.995
p-cresol	0.133	0.359	0.177
m-cresol	0.055	0.949	0.874
4-propilguayacol	0.095	0.567	0.124
4-etilfenol	0.036*	0.593	0.856
eugenol	0.302	0.991	0.121
4-vinilguayacol	0.007*	0.832	0.925
siringol	0.692	0.200	0.483
4-metilsiringol	0.040*	0.841	0.416
isoeugenol (cis+trans)	0.896	0.667	0.748
5-hidroximetil-2-furaldehído	0.061	0.464	0.282
4-alilsiringol	0.973	0.444	0.430
vainillina	0.684	0.232	0.608
acetovanillona	0.002*	0.957	0.989
guayacilacetona	0.366	0.619	0.622
siringaldehído	0.236	0.209	0.329
acetosiringona	0.013*	0.533	0.221
antiarol	0.513	0.540	0.849
coniferil aldehído	0.856	0.313	0.073

*: Diferencias significativas al 95% de probabilidad (p-valor < 0.05).

De los factores estudiados, el sistema de envejecimiento utilizado es el factor que más diferencias significativas presenta, en concreto en 17 variables, concretamente en ocho carbonilos, un derivado bencénico y ocho alcoholes. Se han encontrado diferencias significativas tanto en compuestos característicos del contacto con la madera, mayoritarios como el feniletil alcohol, y minoritarios como 1-hexanal y etilbenceno; como también en aquellos compuestos volátiles muy importantes en la caracterización organoléptica de los vinos, como son los derivados del guayacol y del siringol.

Por otro lado, el origen de la madera sólo presenta diferencias significativas en tres variables y con respecto a la influencia debida a la interacción de ambos factores (sistema-origen), tan sólo se han encontrado diferencias significativas también para tres compuestos: 1-hexanal, etilbenceno y 2-etil-1-hexanol.

Estas diferencias significativas pueden contrastarse mediante diagramas *box-plot* de cada variable. Como ejemplo se muestra en la **Figura 13** la concentración de 1-hexanal en función del sistema de envejecimiento.

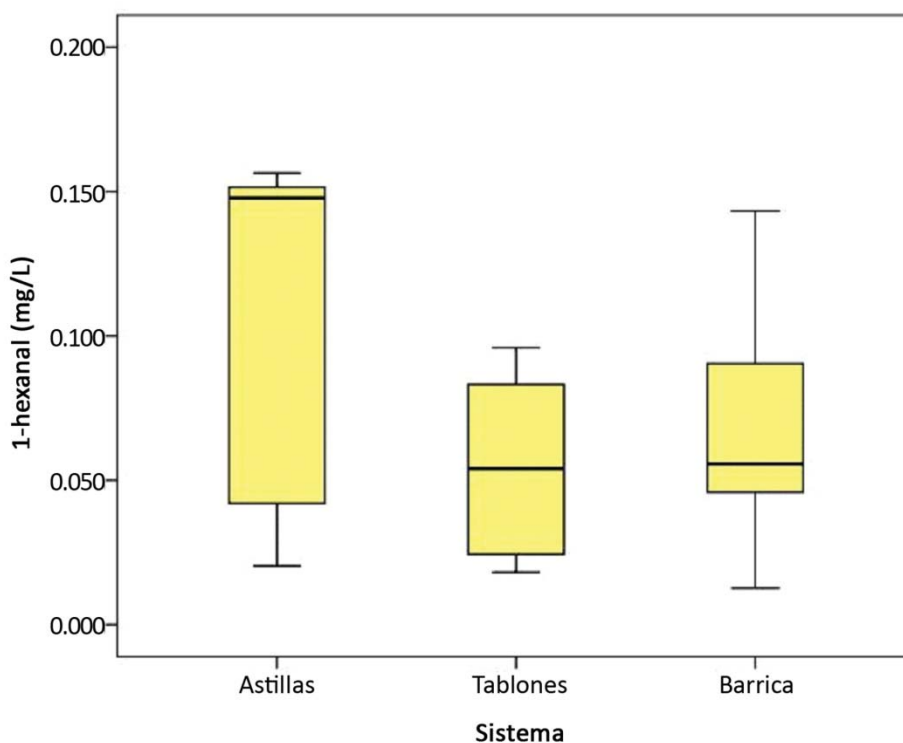


Figura 13. Box-plot correspondiente al perfil de la concentración de 1-hexanal en función del sistema de envejecimiento del vino.

Como se puede apreciar en la **Figura 13**, las diferencias significativas encontradas para la concentración de 1-hexanal pueden explicarse por el mayor contenido para este compuesto en muestras envejecidas mediante astillas.

4.11.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Después de realizar los análisis de varianza y comprobar las diferencias significativas para las muestras de vino en función del sistema de envejecimiento y el origen de la madera de roble utilizada, el siguiente paso consistió en obtener una visión global de los mismos. Al contar con un número elevado de variables, el siguiente paso en el tratamiento de datos mediante estadística descriptiva consistió en realizar un análisis en componentes principales (PCA).

En primer lugar, se contrastó la idoneidad del proceso de obtención de componentes mediante el *test de esfericidad de Barlett*. La significación obtenida permitió considerar la matriz de correlaciones adecuada para realizar el PCA.

En la **Tabla 13** aparecen los valores propios y el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal normalizada. Además, se realizó una rotación de las componentes con el objetivo de hacer más sencilla la interpretación de los pesos de las variables en las componentes, ya que se maximizaban los pesos de las variables en algunas componentes, mientras que para el resto se minimizaban. El método de rotación empleado fue la normalización *Varimax con Kaiser*.

Tabla 13. Varianza total explicada y autovalores en el análisis de componentes principales.

Componente	Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	8,705	21,231	21,231
2	7,149	17,436	38,667
3	5,066	12,357	51,024
4	4,508	10,995	62,019
5	3,243	7,910	69,929
6	3,104	7,570	77,499
7	1,910	4,659	82,158
8	1,596	3,893	86,050

Método de extracción: Análisis de Componentes Principales
Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

La **Tabla 13** muestra que, mediante las dos primeras componentes se explica el 39% de la variabilidad de los datos de origen. Pero además, se recogen hasta ocho componentes ya que, de esta forma, se conseguiría explicar casi completamente la variabilidad de los datos originales. De esta forma, la reducción de la dimensionalidad se consideró adecuada, al pasar de cuarenta variables a ocho componentes, manteniendo un porcentaje aceptable de variabilidad explicada, un **86%**.

En la **Tabla 14** se muestran los pesos de cada una de las variables analizadas en cada una de las ocho componentes. Para una interpretación más sencilla se han suprimido de la tabla los pesos menos significativos (inferiores a 0.70).

Tabla 14. Pesos de los compuestos estudiados en las ocho primeras componentes.

Variable	Componente							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1-hexanal	*	*	*	0.864	*	*	*	*
etilbenceno	*	*	*	0.910	*	*	*	*
2-pentilfurano	*	*	*	*	*	*	*	*
1-hexanol	0.888	*	*	*	*	*	*	*
2-furaldehído	*	*	*	*	0.882	*	*	*
2-etil-1-hexanol	*	*	*	0.844	*	*	*	*
2-furilmetilcetona	*	*	0.769	*	*	*	*	*
benzaldehído	*	*	*	*	*	*	*	*
trans-2-nonenal	0.931	*	*	*	*	*	*	*
5-metil-2-furaldehído	*	*	*	*	0.822	*	*	*
fenilacetaldehído	*	*	*	*	*	*	*	*
acetofenona	*	*	*	0.708	*	*	*	*
guayacol	*	*	0.822	*	*	*	*	*
alcohol bencílico	0.844	*	*	*	*	*	*	*
trans-whiskey-lactona	*	*	*	*	*	0.721	*	*
feniletil alcohol	*	*	*	*	*	*	*	*
4-metilguayacol	*	0.757	*	*	*	*	*	*
cis-whiskey-lactona	*	*	*	*	*	0.766	*	*
benzotiazol	*	*	*	*	*	*	0.819	*
o-cresol	*	*	*	*	*	*	*	*
1H-pirrol-2-carboxaldehído	0.750	*	*	*	*	*	*	*
4-etilguayacol	0.877	*	*	*	*	*	*	*
p-cresol	*	*	*	*	*	*	*	*
m-cresol	0.704	*	*	*	*	*	*	*
4-propilguayacol	*	*	*	*	*	*	*	0.701
4-etilfenol	0.935	*	*	*	*	*	*	*
eugenol	*	*	*	*	*	0.895	*	*
4-vinilguayacol	0.803	*	*	*	*	*	*	*
siringol	*	*	0.749	*	*	*	*	*
4-metilsiringol	*	0.912	*	*	*	*	*	*
isoeugenol (cis+trans)	*	*	*	*	*	*	*	*
5-hidroximetil-2-furaldehído	*	*	*	*	*	*	*	*
4-alilsiringol	*	*	*	*	*	*	*	*
vainillina	*	0.788	*	*	*	*	*	*
acetovanillona	*	0.740	*	*	*	*	*	*
guayacilacetona	*	*	0.796	*	*	*	*	*
siringaldehído	*	0.936	*	*	*	*	*	*
acetosiringona	*	0.890	*	*	*	*	*	*
antiarol	0.767	*	*	*	*	*	*	*
coniferil aldehído	*	*	*	*	*	*	*	*

*: peso < 0.700

Como se puede observar en la **Tabla 14**, las dos primeras componentes estarían definidas por volátiles relativamente abundantes en vinos como el 1-hexanol, así como por alcoholes derivados del guayacol como el 4-metilguayacol, 4-etilguayacol y 4-vinilguayacol; y otros compuestos considerados en la bibliografía como componentes importantes del aroma de los vinos, como son la vainillina, acetovainillona y acetosiringona. Con respecto a la tercera y cuarta componentes, según la **Tabla 13**, engloban un 23% de la variabilidad original de los datos y vendrían determinadas principalmente por 1-hexanal, etilbenceno, 2-furilmetilcetona, acetofenona y guayacilacetona, compuestos característicos del contacto del vino con la madera en procesos de envejecimiento.

Una vez obtenidos los pesos para cada variable en cada componente, se procedió a representar las muestras analizadas en el espacio de las dos primeras componentes, mediante el cálculo de las puntuaciones factoriales de cada una de las muestras. En la **Figura 14** se muestra la representación obtenida en función del **sistema de envejecimiento**.

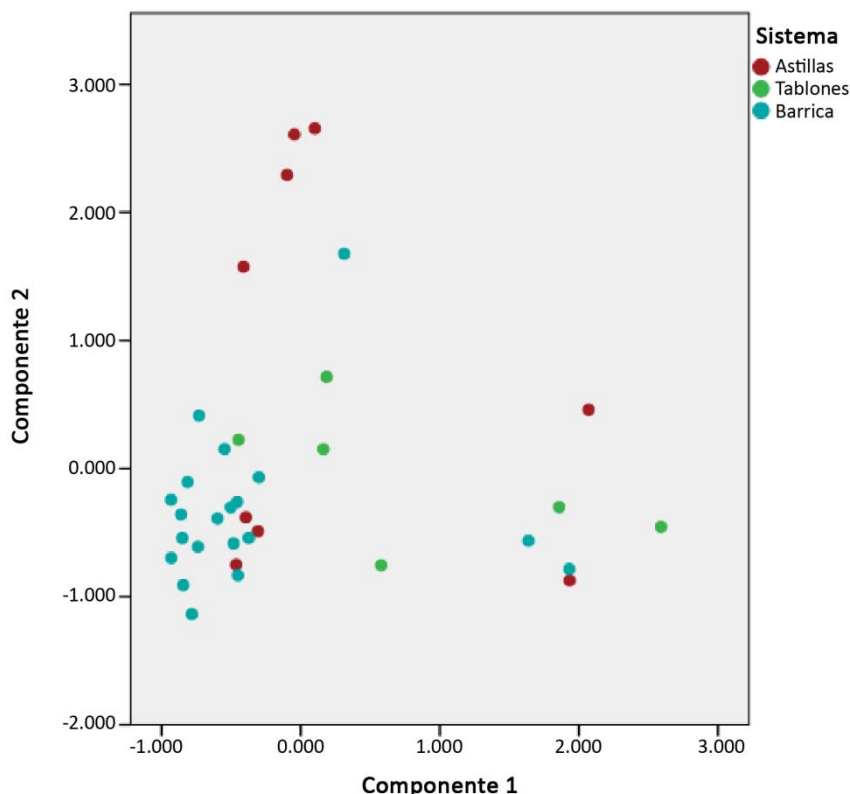


Figura 14. Diagrama de dispersión de las puntuaciones factoriales de los vinos, diferenciadas por su sistema de envejecimiento, en el plano de las componentes 1 y 2.

Visualmente en la **Figura 14**, no se aprecia una clara diferenciación entre los tres grupos de muestras, sin embargo, sí que existen agrupamientos de muestras similares sometidas al mismo sistema de envejecimiento. Se puede destacar, como ejemplo, las puntuaciones elevadas en la segunda componente, para un grupo de muestras envejecidas mediante **astillas**. En ellas se puede afirmar que presentaban concentraciones más elevadas de 4-metilguayacol, 4-metilsiringol, vainillina, acetovanillona, siringaldehído y acetosiringona, que el resto de muestras analizadas y envejecidas en barricas o mediante tablones.

De la misma forma, se puede apreciar en la **Figura 14**, que las muestras envejecidas en barrica poseían, en líneas generales, menores puntuaciones en la primera componente que aquellas que habían sido sometidas a procesos de envejecimiento mediante astillas o tablones. Por lo tanto, se pudo afirmar de una forma general que las muestras envejecidas en **barrica** poseían menores contenidos en aquellos compuestos más mayoritarios, con la excepción del feniletil alcohol, en el perfil aromático de los vinos como el 1-hexanol, alcohol bencílico y 4-etilfenol, por ejemplo.

Por otra parte, en la **Figura 15** se muestra la representación de las muestras analizadas en el espacio de las dos primeras componentes, pero esta vez etiquetadas según el **origen de la madera** empleada para el sistema de envejecimiento.

En este caso, no se puede observar ninguna diferencia entre el origen americano y francés de la madera empleada en el envejecimiento, en cuanto a la representación de las dos primeras componentes del PCA. De modo que las posibles diferencias entre muestras se sospecha que se deben principalmente a su sistema de envejecimiento (**Figura 14**) y no al origen de la madera.

Por tanto, se continúa observando el comportamiento de las muestras de vino en función del sistema de envejecimiento. En la **Figura 16** se muestra la representación de las muestras analizadas en el espacio de la tercera y cuarta componente, etiquetadas según el **sistema de envejecimiento** empleado.

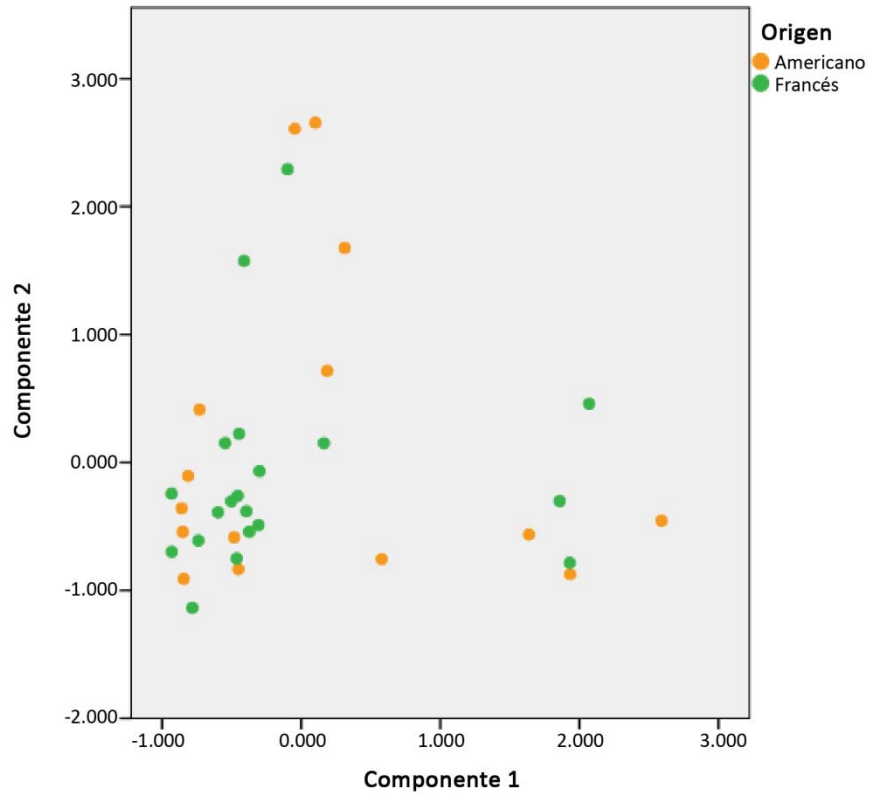


Figura 15. Diagrama de dispersión de las puntuaciones de los vinos, diferenciadas por la naturaleza de la madera utilizada para el envejecimiento de los vinos, en el plano de las componentes 1 y 2.

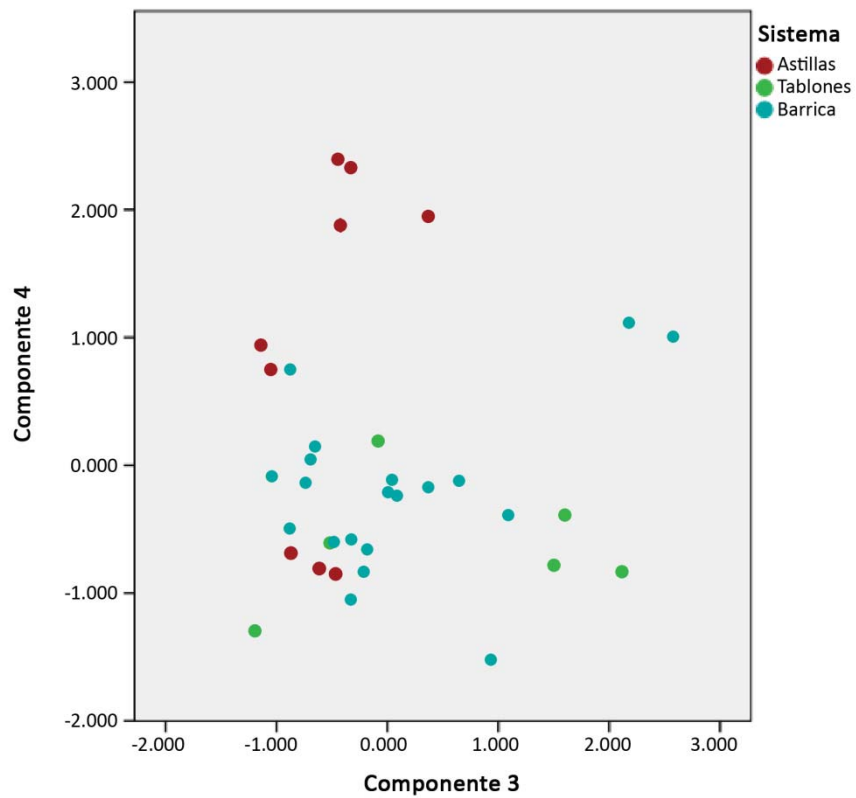


Figura 16. Diagrama de dispersión de las puntuaciones factoriales de los vinos, diferenciadas por su sistema de envejecimiento, en el plano de las componentes 3 y 4.

Se observa en la **Figura 16** que la mayoría de muestras envejecidas mediante **astillas** presentaban puntuaciones elevadas en la cuarta componente principal, de modo que se puede afirmar que presentaban concentraciones más elevadas en compuestos característicos del contacto con madera como acetofenona, etilbenceno y 1-hexanal.

4.11.4. ANÁLISIS CLÚSTER

Continuando con la estadística descriptiva, se llevó a cabo un análisis clúster (CA) con el objetivo de buscar posibles agrupamientos de muestras con similares perfiles aromáticos y comprobar si estos clúster estaban formados por vinos sometidos a un mismo sistema de envejecimiento, factor que ha resultado significativo en el análisis en componentes principales.

En la **Figura 17** se observa el clúster obtenido con el criterio de proximidad establecido mediante la distancia euclídea.

A partir del dendrograma, se deduce que existían principalmente cuatro agrupamientos de muestras similares que, según el sistema de envejecimiento se podrían dividir en: dos zonas distintas correspondientes a vinos envejecidos en barrica, una zona constituida prácticamente por la totalidad de muestras envejecidas mediante astillas y otro agrupamiento más, no tan claro en cuanto a su clasificación en un sistema concreto, ya que se trataba de muestras envejecidas tanto en barrica como con tablones.

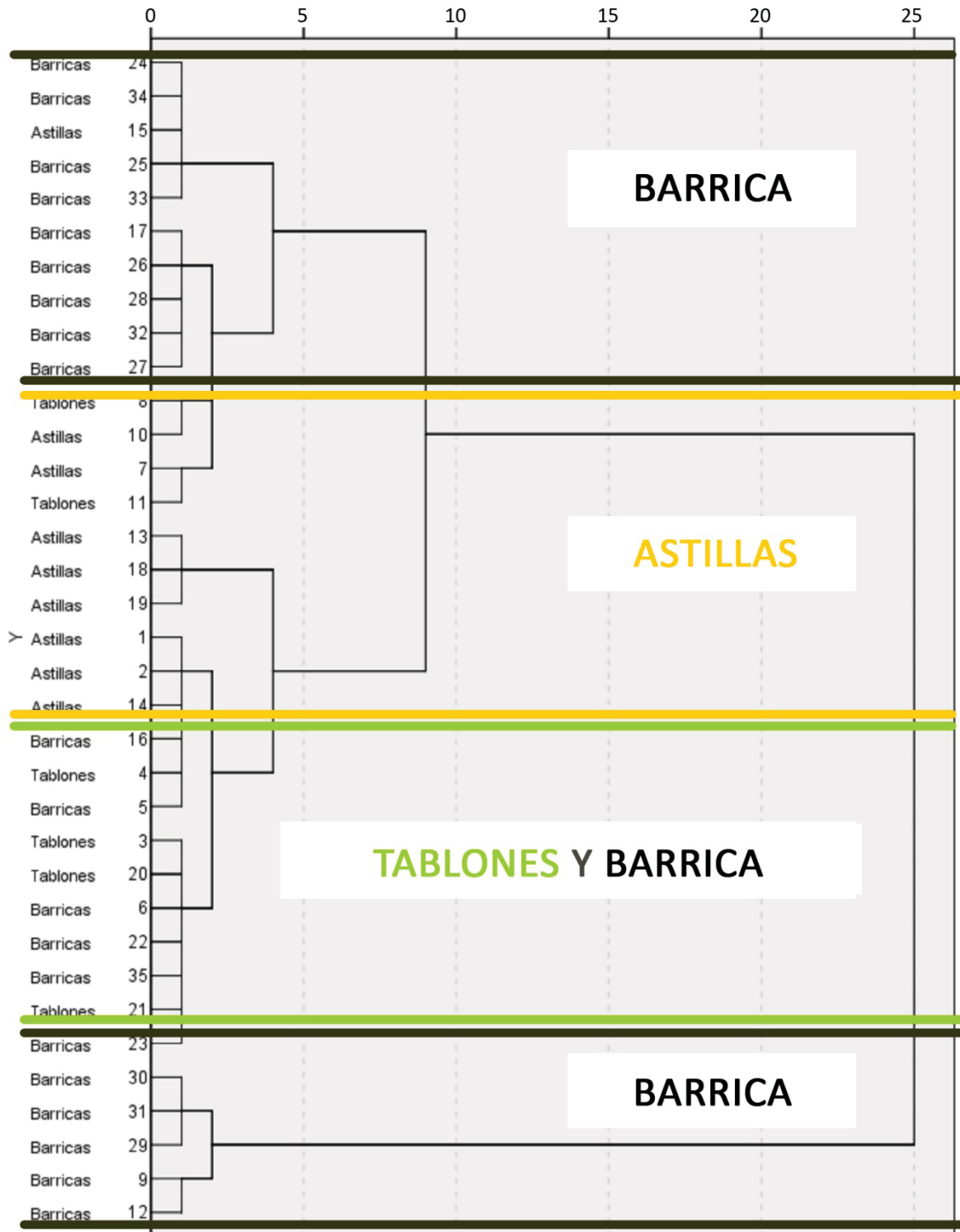


Figura 17. Dendrograma de conglomerados de distancia re-escalados.

4.11.5. ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Una vez finalizado el análisis de los resultados mediante estadística descriptiva, se llevó a cabo un análisis mediante estadística predictiva. En esta sección se exponen los resultados obtenidos para la discriminación de las 35 muestras, en función del sistema de envejecimiento al cual fueron sometidos los vinos.

4.11.5.1. DISCRIMINACIÓN CONJUNTA

En primer lugar, se realizó un análisis discriminante canónico para separar los vinos de los tres tipos de sistema de envejecimiento en un solo paso. Se llevó a cabo una selección previa de variables según el criterio de menor *lambda de Wilks*. En la **Tabla 15** se muestran los coeficientes estandarizados para las variables con mayor poder discriminante de cada grupo o sistema de envejecimiento en cada función canónica discriminante.

Tabla 15. Coeficientes estandarizados de las funciones canónicas en la discriminación entre el sistema de envejecimiento.

Coeficientes estandarizados		
Variable	Función	
	1	2
trans-2-nonenal	1.358	-0.677
acetofenona	0.592	0.280
trans-whiskey-lactona	-0.131	0.949
1H-pirrol-2-carboxaldehído	-1.672	-0.258

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos

Como se puede observar en la **Tabla 15**, las variables con mayor poder discriminante son **trans-2-nonenal** y **trans-whiskey-lactona**, compuestos muy importantes en la caracterización aromática de los vinos, junto con **acetofenona** y **1H-pirrol-2-carboxaldehído**, compuestos característicos y específicos del contacto del vino con la madera.

Una vez construidas las funciones discriminantes canónicas, se calcularon las puntuaciones discriminantes para ambas funciones en las 35 muestras (**Figura 18**).

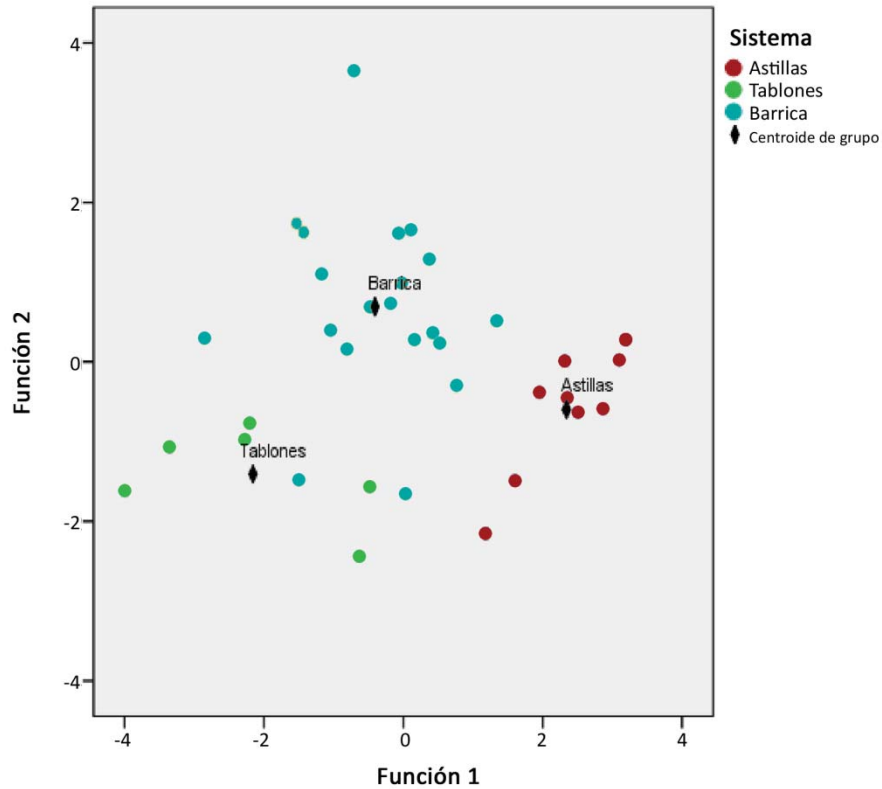


Figura 18. Puntuaciones discriminantes obtenidas para las dos primeras funciones canónicas, en función del sistema de envejecimiento.

En la **Figura 18** se aprecian las puntuaciones discriminantes de las 35 muestras de vino para las dos primeras funciones canónicas discriminantes en función del sistema de envejecimiento. Además, aparecen representados los centroides de cada sistema de envejecimiento, cuyas coordenadas están detalladas en la **Tabla 15**. A partir de esta figura se dedujo que las muestras envejecidas en astillas ocupaban un espacio en el gráfico, perfectamente diferenciado de los grupos de envejecimiento en barrica y tablones, los cuales a su vez, tenían una zona predominante en el gráfico, aunque algunas muestras envejecidas en sistemas distintos se encontraban próximas entre sí.

Como resumen, en la **Tabla 16** se detallan los porcentajes de muestras correctamente clasificadas, tanto en clasificación directa como en predicción mediante validación cruzada.

Tabla 16. Porcentajes de muestras correctamente clasificadas tanto en clasificación directa como en validación cruzada.

Resultados de la clasificación ^{b,c}	Sistema	Grupo de pertenencia pronosticado			Total	
		Astillas	Tablones	Barrica		
Original	Recuento	Astillas	9	0	0	9
		Tablones	0	6	0	6
		Barrica	1	3	16	20
	%	Astillas	100.0	0.0	0.0	100.0
		Tablones	0.0	100.0	0.0	100.0
		Barrica	5.0	15.0	80.0	100.0
Validación cruzada ^a	Recuento	Astillas	9	0	0	9
		Tablones	0	5	1	6
		Barrica	2	3	15	20
	%	Astillas	100.0	0.0	0.0	100.0
		Tablones	0.0	83.3	16.7	100.0
		Barrica	10.0	15.0	75.0	100.0

^a. La validación cruzada sólo se aplica a los casos del análisis. En la validación cruzada, cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas a partir del resto de los casos.

^b. Clasificados correctamente el **88.6%** de los casos agrupados originales.

^c. Clasificados correctamente el **82.9%** de los casos agrupados validados mediante validación cruzada.

Respecto a los porcentajes de muestras correctamente clasificadas, cabe destacar que el **100%** de muestras envejecidas con **astillas** se clasificaban correctamente, mientras que en el caso de las muestras envejecidas en **barrica** el porcentaje era del **75%** ya que algunas muestras envejecidas mediante este sistema clásico se clasificaban como envejecidas en sistemas de astillas o tablones. Globalmente se puede concluir que el **porcentaje de éxito en la discriminación de las muestras superaba el 80%**.

Por último, y una vez obtenidos los porcentajes de predicción con validación cruzada, se calculó la fiabilidad en la clasificación, es decir, qué porcentaje de probabilidad había de que una muestra clasificada dentro de un grupo perteneciese realmente a ese grupo. Para ello, se empleó el *teorema de Bayes*.

Tabla 17. Probabilidades de que un vino clasificado en un sistema de envejecimiento pertenezca realmente a dicho sistema.

Sistema envejecimiento	Probabilidad
Astillas	91 %
Tablones	85 %
Barrica	82 %

La **Tabla 17** muestra los porcentajes obtenidos en la aplicación de las fórmulas anteriores. Los mejores resultados se obtuvieron para el envejecimiento mediante astillas, de modo que si un vino se clasificaba como perteneciente a este grupo, se tenía un 91% de probabilidades de acierto. A continuación, el mayor porcentaje se obtuvo para el envejecimiento mediante el empleo de tablonos, con un 85% de acierto al clasificar un vino en este grupo. Finalmente, el menor porcentaje de fiabilidad lo presentaban las muestras clasificadas como vino envejecido en barrica, con un 82%.

4.11.5.2. DISCRIMINACIÓN POR ETAPAS

Con el objetivo de conseguir mejores resultados, se ensayó una discriminación por etapas, teniendo en cuenta que *a priori* el grupo de muestras envejecidas con un sistema de astillas era muy diferente al resto de muestras. Por tanto, en una primera etapa se discriminaron los vinos envejecidos mediante astillas del resto. De esta forma, se sospechaba que los resultados serían mejores, ya que las puntuaciones discriminantes de las 35 muestras en la discriminación conjunta, representadas en la **Figura 18**, mostraban que el envejecimiento mediante astillas ocupaba un espacio en el gráfico bastante diferenciado de los grupos de envejecimiento en barrica y tablonos. Posteriormente, se realizó un segundo análisis discriminante entre los vinos envejecidos mediante tablonos y en barrica.

Igual que en el análisis discriminante anterior, se llevó a cabo de nuevo una selección de variables según el método *lambda de Wilks*. Después, aplicando el análisis discriminante, se obtuvieron los coeficientes estandarizados de la función canónica para las variables con mayor poder discriminante, todos ellos recogidos en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Coeficientes estandarizados de la función canónica en la discriminación entre sistemas de envejecimiento mediante astillas y tablonos+barrica.

Coeficientes estandarizados	
Variable	Función
	1
trans-2-nonenal	-1.546
acetofenona	-0.394
trans-whiskey-lactona	0.576
1H-pirrol-2-carboxaldehído	1.587

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos.

Las variables seleccionadas con mayor poder discriminante fueron, por orden de importancia, **1H-pirrol-2-carboxaldehído**, **trans-2-nonenal**, **trans-whiskey-lactona** y **acetofenona**, las mismas que se obtuvieron en la discriminación conjunta. En este caso, los porcentajes de muestras correctamente clasificadas se muestran en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Resultados de la discriminación entre vinos envejecidos con astillas frente a vinos envejecidos con barricas o mediante tablones.

Resultados de la clasificación ^{b,c}		Sistema	Grupo de pertenencia pronosticado		Total
			Astillas	Tablones+barrica	
Original	Recuento	Astillas	9	0	9
		Tablones+barrica	0	26	26
	%	Astillas	100.0	0.0	100.0
		Tablones+barrica	0.0	100.0	100.0
Validación cruzada ^a	Recuento	Astillas	8	1	9
		Tablones+barrica	2	24	26
	%	Astillas	88.9	11.1	100.0
		Tablones+barrica	7.7	92.3	100.0

^a. La validación cruzada sólo se aplica a los casos del análisis. En la validación cruzada, cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas a partir del resto de los casos.

^b. Clasificados correctamente el **100.0%** de los casos agrupados originales.

^c. Clasificados correctamente el **91.4%** de los casos agrupados validados mediante validación cruzada.

Como se puede observar en la **Tabla 19**, el **porcentaje global** de muestras correctamente clasificadas tras la validación cruzada **superaba el 90%** ya que, únicamente una muestra envejecida en astillas y dos muestras envejecidas en barricas se clasificaban incorrectamente.

El segundo paso consistió en discriminar entre muestras envejecidas en barricas y mediante tablones. Para ello, se procedió de la misma forma que en la primera discriminación, seleccionando aquellas variables con mayor poder discriminante según el criterio de menor *lambda de Wilks*. Las variables con mayor poder discriminante se reflejan en la **Tabla 20** donde se muestra la función canónica discriminante obtenida.

Tabla 20. Coeficientes estandarizados de la función canónica en la discriminación entre sistemas de envejecimiento mediante tablonos y en barrica.

Coeficientes estandarizados	
Variable	Función
	1
5-metil-2-furaldehído	1.950
4-etilguayacol	2.303
4-vinilguayacol	-1.125

Funciones discriminantes canónicas no tipificadas evaluadas en las medias de los grupos.

Como se refleja en la **Tabla 20**, fueron seleccionadas únicamente 3 variables. Por un lado **4-etilguayacol** y **4-vinilguayacol**, compuestos muy característicos del perfil aromático de los vinos, tal y como se ha descrito en la bibliografía y, por otro lado, **5-metil-2-furaldehído** que, *a priori*, no es tan determinante como los dos anteriores pero que, sin embargo, se trata de un compuesto con poder discriminante entre vinos envejecidos en barrica y mediante tablonos.

Empleando la función canónica discriminante descrita en la **Tabla 20** los resultados obtenidos en la discriminación se muestran en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Resultados de la clasificación directa y mediante validación cruzada en la discriminación entre vinos envejecidos en barrica y mediante tablonos

Resultados de la clasificación ^{b,c}	Sistema	Grupo de pertenencia pronosticado		Total	
		Tablonos	Barrica		
Original	Recuento	Tablonos	6	0	6
		Barrica	1	17	18
		Casos desagrupados	1	0	1
	%	Tablonos	100.0	0.0	100.0
		Barrica	5.6	94.4	100.0
		Casos desagrupados	100.0	0.0	100.0
Validación cruzada ^a	Recuento	Tablonos	6	0	6
		Barrica	1	17	18
	%	Tablonos	100.0	0.0	100.0
		Barrica	5.6	94.4	100.0

^a. La validación cruzada sólo se aplica a los casos del análisis. En la validación cruzada, cada caso se clasifica mediante las funciones derivadas a partir del resto de los casos.

^b. Clasificados correctamente el **95.8%** de los casos agrupados originales.

^c. Clasificados correctamente el **95.8%** de los casos agrupados validados mediante validación cruzada.

El **porcentaje de muestras correctamente clasificadas superó el 95%** con validación cruzada, ya que tan sólo una muestra envejecida en la barrica convencional se clasificó erróneamente. Y, con respecto a la muestra de astillas que se clasificó en la discriminación anterior como envejecida en tablones+barrica, mediante esta etapa de discriminación se clasificó finalmente como envejecida en tablones, es decir, como envejecida mediante sistemas no convencionales, y no mediante el sistema clásico de barrica.

Finalmente, y aplicando el *teorema de Bayes* se calculó la probabilidad que había de que una muestra clasificada en uno de los grupos perteneciese realmente a ese grupo, teniendo en cuenta los resultados de las dos etapas del análisis discriminante. Los resultados aparecen en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Probabilidades de que un vino clasificado en un sistema de envejecimiento pertenezca realmente a dicho sistema.

Sistema envejecimiento	Probabilidad
Astillas	90 %
Tablones	84 %
Barrica	100 %

Los porcentajes fueron del 90% y 84% en el caso de vinos envejecidos mediante sistemas acelerados: astillas y tablones respectivamente. En el caso de vinos envejecidos en barricas el porcentaje fue del 100% ya que ninguna muestra envejecida con astillas o tablones se clasificó como en el grupo de barrica.

Globalmente, de las 35 muestras analizadas, mediante este análisis discriminante por etapas tan sólo 4 se clasificaron incorrectamente, con porcentajes de fiabilidad del **87%** en el caso de considerar envejecimiento acelerado (astillas o tablones) y **100%** de fiabilidad si la muestra se clasificaba como envejecida en barrica.

4.12. CONSECUENCIAS

Se ha puesto a punto y validado un método de análisis para 40 compuestos volátiles en vino, mediante un tratamiento de muestra de extracción en fase sólida, optimizado empleando herramientas de diseño de experimentos, como el cribado mediante un diseño factorial fraccional y la optimización mediante un diseño central compuesto y posterior análisis mediante GC-MS.

Se ha aplicado el método propuesto al análisis de 35 muestras de vinos sometidos a procesos de envejecimiento mediante el sistema clásico de bodega y también mediante contacto con astillas y tablonos de madera de roble.

Mediante medidas estadísticas descriptivas se ha obtenido el perfil para el contenido en 40 compuestos volátiles en muestras de vinos de la Ribera de Duero, en función de su sistema de envejecimiento, mediante astillas o tablonos de madera de roble o bien mediante el sistema clásico en bodegas.

Se han encontrado diferencias significativas con respecto a dichos sistemas de envejecimiento para 17 compuestos volátiles y, con respecto al origen de la madera empleado para el envejecimiento, tan sólo en 3 compuestos. La conjunción de ambos factores reflejó diferencias significativas para también 3 compuestos volátiles.

Se ha establecido, también mediante herramientas de estadística descriptiva, que existían grupos de muestras similares desde el punto de vista de su fracción volátil y que dichos agrupamientos podían, en ocasiones, asignarse a un mismo sistema de envejecimiento.

Mediante el contenido en 7 compuestos volátiles como trans-2-nonenal, acetofenona, trans-whiskey-lactona, 1H-pirrol-2-carboxaldehído, 5-metil-2-furaldehído, 4-etilguayacol y 4-vinilguayacol, ha sido posible discriminar correctamente en función de su sistema de envejecimiento un 89 % de las muestras analizadas, empleando validación cruzada. La fiabilidad en la clasificación fue de un 100 % si la muestra se clasificaba como envejecida en bodega y de un 90% y 84% si el sistema de envejecimiento era mediante astillas o tablonos, respectivamente.

4.13. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ S. Selli, T. Cabaroglu, A. Canbas, H. Erten, C. Nurgel, J.P. Lepoutre, Z. Gunata. *Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasi grown in central Anatolia*. Food Chemistry, 85 (2004) 207–213.
- ² P. Hernández-Orte, A.C. Lapeña, A. Escudero, J. Astrain, C. Baron, I. Pardo, L. Polo, S. Ferrer, J. Cacho, V. Ferreira. *Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wines: Malolactic fermentation and ageing in wood*. LWT-Food Science and Technology, 42 (2009) 391-401.
- ³ P.M. Izquierdo Cañas, E. García Romero, S. Gómez Alonso, M.L.L. Palop Herreros. *Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation*. Journal of Food Composition and Analysis, 21 (2008) 724-730.
- ⁴ J.J. Rodríguez-Bencomo, J.E. Conde, M.A. Rodríguez-Delgado, F. García-Montelongo, J.P. Pérez-Trujillo. *Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 963 (2002) 213–223.
- ⁵ M. P. Marti, M. Mestres, C. Sala, O. Busto, J. Guasch. *Solid-phase microextraction and gas-chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51 (2003) 7861–7865.
- ⁶ E. Koussissi, V.G. Dourtoglou, G. Ageloussis, Y. Paraskevopoulos, T. Dourtoglou, A. Paterson, A. Chatzilazarou. *Influence of toasting of oak chips on red wine maturation from sensory and gas chromatographic headspace analysis*. Food Chemistry, 114 (2009) 1503-1509.
- ⁷ B. Fernández de Simón, J. Martínez, M. Sanz, E. Cadahía, E. Esteruelas, A.M. Muñoz. *Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels*. Food Chemistry, 147 (2014) 346-356.
- ⁸ D. Bajcan, S. Ceryova, T. Toth. *Phenolic compounds and antioxidant activity of monovarietal red wines produced in Limbach region*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 1 (2012) 868-875.
- ⁹ J.J. Moreno, R.A. Peinado. *Química enológica*. AMV, Ediciones; Mundi-Prensa Libros, S.A. (2010).
- ¹⁰ W. Cynkar, R. Damberg, P. Smith, Daniel Cozzolino. *Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics*. Analytica Chimica Acta, 660 (2010) 227-231.
- ¹¹ T. Garde-Cerdán, C. Lorenzo, J.M. Carot, J.M. Jabaloyes, M.D. Esteve, M.R. Salinas. *Statistical differentiation of wines of different geographic origin and aged in barrel according to some volatile components and ethylphenols*. Food Chemistry, 111 (2008) 1025–1031.

- ¹² S. Cabredo-Pinillos, T. Cedrón-Fernández, C. Sáenz-Barrio. *Differentiation of “Claret”, Rose’, Red and Blend wines based on the content of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography*. European Food Research and Technology, 226 (2008) 1317–1323.
- ¹³ M. del Álamo, I. Nevares, L. Gallego, B. Fernández de Simón, E. Cadahía. *Micro-oxygenation strategy depends on origin and size of oak chips or staves during accelerated red wine aging*. Analytica Chimica Acta, 660 (2010) 92-101.
- ¹⁴ M.T. Frangipane, D. De Santis, A. Ceccarelli. *Influence of oak woods of different geographical origins on quality of wines aged in barriques and using oak chips*. Food Chemistry, 103 (2007) 46-54.
- ¹⁵ R. Bozalongo, J.D. Carrillo, M. A. Fernández Torroba, M.T Tena. *Analysis of French and American oak chips with different toasting degrees by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1173 (2007) 10-17.
- ¹⁶ R.M. Callejón, M.J. Torija, A. Mas, M.L. Morales, A.M. Troncoso. *Changes of volatile compounds in wine vinegars during their elaboration in barrels made from different woods*. Food Chemistry, 120 (2010) 561-571.
- ¹⁷ G. Kozlovic, A. Jeromel, L. Maslov , A. Pollnitz , S. Orlic. *Use of acacia barrique barrels– Influence on the quality of Malvazija from Istria wines*. Food Chemistry, 120 (2010) 698-702.
- ¹⁸ Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino. BOE-A-2003-13864. Boletín Oficial del Estado, nº 165, de 11 de julio de 2003, 27165-27179.
- ¹⁹ Reglamento (CE) nº 7292/2008, de 25 abril. Diario Oficial de la Unión Europea, 26 de abril de 2008.
- ²⁰ R. Hooper, A. Marks. *New product for introducing oak-derived flavours and aromas to wine*. The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker, 337 (1992) 25-26.
- ²¹ B. Fernández de Simón, E. Cadahía, M. del Álamo, I. Nevares. *Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them*. Analytica Chimica Acta, 660 (2010) 211-220.
- ²² N. Natali, F. Chinnici, C. Riponi. *Characterization of volatiles in extracts from oak chips obtained by Accelerated Solvent Extraction (ASE)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (2006) 8190-8198.
- ²³ Reglamento (CE) Nº 1507/2006, de 11 de octubre. Diario Oficial de la Unión Europea, 12 de octubre de 2006, L280/9-L280/11.
- ²⁴ E. Gómez García-Carpintero, M.A. Gómez Gallego, E. Sánchez-Palomo, M.A. González Viñas. *Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic*

fermentation on volatile and sensory composition of red wines. Food Chemistry, 134 (2012) 851-863.

- ²⁵ M. Ortega-Heras, S. Pérez-Magariño, E. Cano-Mozo, M.L. González-San José. *Differences in the phenolic composition and sensory profile between red wines aged in oak barrels and wines aged with oak chips*. LWT-Food Science and Technology, 43 (2010) 1533-1541.
- ²⁶ M.J. Cejudo-Bastante, I. Hermosín-Gutiérrez, M.S. Pérez-Coello. *Improvement of Cencibel red wines by oxygen addition after malolactic fermentation: study on color-related phenolics, volatile composition, and sensory characteristics*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (2012) 5962-5973.
- ²⁷ J. Saurina. *Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics*. Trends in Analytical Chemistry, 29 (3) (2010) 234-245.
- ²⁸ C. Pizarro, S. Rodríguez-Tecedor, I. Esteban-Díez, N. Pérez-del-Notario, J.M. González-Sáiz. *Experimental design approach to evaluate the impact of oak chips and micro-oxygenation on the volatile profile of red wines*. Food Chemistry, 148 (2014) 357-366.
- ²⁹ M. González Álvarez, C. González-Barreiro, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara. *Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS*. Food Chemistry, 129 (2011) 890-898.
- ³⁰ K. Hron, M. Jelinkova, P. Filzmoser, R. Kreuziger, P. Bednai, P. Bartak. *Statistical analysis of wines using a robust compositional biplot*. Talanta, 90 (2012) 46-50.
- ³¹ Y. Niu, X. Zhang, Z. Xiao, S. Song, K. Eric, C. Jia, H. Yu, J. Zhu. *Characterization of odor-active compounds of various cherry wines by gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-olfactometry and their correlation with sensory attributes*. Journal of Chromatography B, 879 (2011) 2287-2293.
- ³² D. Serrano-Lourido, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, A. Checa. *Classification and characterisation of Spanish red wines according to their appellation of origin based on chromatographic profiles and chemometric data analysis*. Food Chemistry, 135 (2012) 1425-1431.
- ³³ S.T. Chin, G.T. Eyres, P.J. Marriott. *Identification of potent odourants in wine and brewed coffee using gas chromatography-olfactometry and comprehensive two-dimensional gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 7487-7498.
- ³⁴ J. Vestner, S. Malherbe, M. du Toit, H.H. Nieuwoudt, A. Mostafa, T. Gorecki, A.G.J. Tredoux, A. de Villiers. *Investigation of the volatile composition of Pinotage wines fermented with different malolactic starter cultures using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of flight mass spectrometry (GCxGC-TOF-MS)*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 59 (2011) 12732-12744.
- ³⁵ D. Cozzolino, W. Cynkar, N. Shah, P. Smith. *Technical solutions for analysis of grape juice, must, and wine: the role of infrared spectroscopy and chemometrics*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401 (2011) 1475-1484.

- ³⁶ H. Franquet-Griell, A. Checa, O. Núñez, J. Saurina, S. Hernández-Cassou, L. Puignou. *Determination of polyphenols in Spanish wines by capillary zone electrophoresis. Application to wine characterization by using chemometrics.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (2012) 8340-8349.
- ³⁷ EURACHEM and CITAC. *Guide to Quality in Analytical Chemistry. An aid to Accreditation.* (2002). <http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/qa>

**PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN PATATAS FRITAS
EN FUNCIÓN DE LA VARIEDAD DE PATATA**

5.1. INTRODUCCIÓN

Las patatas fritas son, actualmente, uno de los aperitivos más consumidos, de forma que están incorporados en los hábitos alimenticios de la población de todo el mundo. Por lo tanto, es esencial realizar una evaluación de su composición, ya que son alimentos con alto contenido calórico que repercuten sobre nuestra salud^{38,39}.

La determinación de la composición de ácidos grasos en diferentes matrices es un problema debido, principalmente, a la disparidad en las matrices y el contenido y forma en que se presentan los ácidos grasos en cada tipo de muestra. A lo largo de las últimas décadas, esta determinación ha sufrido notables cambios. En un principio, los datos se reducían a los ácidos grasos mayoritarios, como consecuencia de las dificultades analíticas para obtener más información y también de las fases estacionarias polares de las columnas utilizadas, más inestables térmicamente. Actualmente, ha aumentado el número de ácidos grasos identificados, ayudando a comprender mejor las características de los productos alimentarios. Por tanto, la tendencia actual está enfocada hacia la determinación de ácidos grasos específicos como, por ejemplo, algunos del tipo omega-3 (ω -3)³⁹⁻⁴¹: ácido α -linolénico (C18:3(n3)), ácido cis,cis,cis,cis,cis-5,8,11,14,17 eicosapentaenoico (C20:5(n3)) y ácido cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico (C22:6(n3)); y otros que han adquirido importancia tanto por sus propiedades en producción animal como por su efecto sobre la salud humana, como los ácidos grasos trans^{38,42,43} y los ácidos linolénicos conjugados (CLA)⁴⁴.

La presencia de diferentes ácidos grasos en las patatas fritas se debe a varios factores derivados del proceso de fabricación pero, en primer término, depende del tipo de aceite de fritura utilizado y la variedad de patata. En cuanto al aceite utilizado, actualmente las industrias alimentarias están aumentando el compromiso con la salud de los consumidores mediante la realización de investigaciones sobre la calidad de los aceites utilizados para freír los alimentos⁴². Los aceites vegetales son los más utilizados, ya que existen gran variedad aptos en alimentación. Por tanto, el producto final puede contener una gran diversidad de ácidos grasos, dependiendo del aceite vegetal empleado⁴⁵. Al mismo tiempo, también debe considerarse la variedad de patata, puesto que durante la fritura, el agua presente en la patata cruda se evapora, sustituyéndose parcialmente por el aceite, lo que constituye hasta un 40% del producto final y, por consiguiente, influye en sus propiedades. Esto afecta no sólo al sabor y aroma del producto, sino también a la textura, de acuerdo con la cantidad de aceite absorbido durante la fritura⁴⁵. Por lo tanto, la selección de la variedad de patata en función de

sus propias características físico-químicas⁴⁶ está relacionada con el contenido de aceite y el contenido de ácidos grasos en las patatas fritas. A pesar de la existencia de estudios en los que se evaluó el efecto del aceite de fritura (tipo, temperatura, etc.) en el contenido final de ácidos grasos de patatas fritas⁴⁵⁻⁴⁷, hasta ahora no se había llevado a cabo un análisis detallado de la relación entre la variedad de patata solamente, o en combinación con el aceite de fritura, y el perfil de ácidos grasos.

La técnica analítica empleada con más frecuencia para separar e identificar los ácidos grasos ha sido la GC acoplada a diferentes detectores, básicamente el FID generalmente para la identificación de los ácidos grasos totales^{38,39,45}, o la MS, principalmente qMS⁴⁸⁻⁵¹, para la identificación de ácidos grasos minoritarios.

La cromatografía de líquidos, HPLC, no se utiliza frecuentemente como técnica de análisis de ácidos grasos. Sin embargo, algunos autores han realizado estudios comparativos entre HPLC-MS y GC-FID, específicamente para la determinación de ácidos grasos en muestras de patatas fritas, concluyendo que sus resultados eran buenos y perfectamente comparables. Aunque para el análisis de un elevado número de ácidos grasos recomendaban el uso de la cromatografía en fase gaseosa⁴⁷.

Por último, en cuanto a técnicas de separación e identificación, cabe destacar el reciente interés y desarrollo de las técnicas de separación multidimensionales (MDGC)^{52,53} y, más concretamente, la GC×GC^{41,54,55} para el análisis de muestras complejas como lo son las alimentarias; utilizando tanto detectores FID^{41,54} como de espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF)^{54,55}.

En cuanto al tratamiento de muestra, existe una gran variedad de métodos de extracción utilizados hasta la actualidad, dependiendo del tipo de matriz y de la naturaleza de los lípidos a extraer (longitud de cadena, ramificación, grado de insaturaciones, posición y geometría de dobles enlaces). Uno de los métodos de extracción más extendido, sin considerar los métodos oficiales para la determinación de grasa total (específicos para carnes y cereales), ha sido el descrito por Folch *et al.*⁵⁶. Este método ha sufrido modificaciones⁵⁷⁻⁵⁹, algunas más conocidas como la de Bligh & Dyer⁵⁷, pero todas mantienen el mismo principio de extracción basado en la mezcla de cloroformo/metanol para poder extraer tanto lípidos neutros como polares.

La extracción Soxhlet ha sido probablemente otra de las técnicas más utilizadas para la extracción de grasas y aceites a partir de matrices de alimentos^{45,46,49}. El éter de petróleo y el éter dietílico^{45,49,59} son los disolventes recomendados por la *AOAC International* para la determinación de grasas mediante el sistema Soxhlet, aunque también se utilizan en menor medida otros disolventes, como el n-hexano, para extraer y analizar todo tipo de grasas^{59,60}.

Existen otros métodos de extracción utilizados en menor medida, como son el uso de mezclas n-propanol/agua o la digestión ácida previa a la extracción de una muestra, específicos para disociar fuerzas intermoleculares entre lípidos y almidón o proteínas⁵⁹.

Recientemente, se han desarrollado métodos ASE^{38,48} o con equipos que aplican microondas⁵⁰. En un principio, su aplicación está limitada a la digestión de muestras, sin embargo, tiene la ventaja de no requerir muestras que carezcan de agua. Por último, otro de los métodos de uso reciente es la extracción con fluidos supercríticos (SFE)^{48,51}, importante por su aplicabilidad no sólo a nivel de laboratorio, ya que evita el uso de disolventes orgánicos.

Una vez extraídos los lípidos de la matriz, han de hidrolizarse para liberar los ácidos grasos y, a continuación, formar compuestos más volátiles perfectamente separables mediante GC. Se consigue su derivatización a compuestos más volátiles a través de la reacción de esterificación, es decir, hacer reaccionar a los ácidos grasos con un alcohol, en presencia de un catalizador, para acelerar el equilibrio hacia la formación de los ésteres. La técnica más común de derivatización consiste en una metilación, generalmente en ésteres metílicos (FAME), utilizando catalizadores ácidos o básicos. Para su realización, se utilizan diversos procedimientos y reactivos, entre los cuales el más utilizado es el hidróxido potásico (KOH) en metanol con catalizador ácido trifluoruro de boro (BF₃)^{45,48-51,58,60}, por su rápida metilación y su mayor vida media. La única desventaja que presenta, sólo en algunas matrices, es la isomerización de dienos conjugados, por ejemplo, para ácidos grasos tipo CLA en productos lácteos.

Otro reactivo utilizado en menor medida es el metóxido de sodio en metanol⁵⁸, el cual no isomeriza dienos conjugados, sin embargo, el proceso requiere más tiempo y material de vidrio. La trimetilguanidina (TMG) es otro catalizador básico de similar reactividad al anterior, cuyos estudios no dan resultados tan satisfactorios en la derivatización de ácidos grasos libres⁵⁸. Por último, existe otro método que utiliza hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH) pero tampoco es recomendable para este tipo de matrices⁵⁸.

En cuanto al tratamiento de datos, cuando hay un elevado número de compuestos, resulta necesario el empleo de estadística de análisis multivariante^{45,46,60}. Las herramientas de estadística descriptiva más utilizadas son el análisis de varianza, ANOVA, para determinar si existen diferencias significativas entre las variables medidas; y el PCA, útil para reducir un número elevado de variables iniciales a unas pocas componentes principales, que expliquen de forma más sencilla y visual la variabilidad original de los datos.

Por tanto, el objetivo principal de este estudio ha consistido en analizar en detalle la influencia de la variedad de patata, como único factor, o combinado con el efecto del aceite vegetal empleado, en el contenido de ácidos grasos de las patatas fritas comerciales. Para lograr este objetivo, se ha empleado la técnica GC-MS para la separación, identificación y cuantificación analítica. Con el fin de extraer la mayor cantidad posible de ácidos grasos de las muestras de patatas fritas, se han ensayado cuatro procedimientos diferentes de extracción sólido-líquido, optimizando además las condiciones de derivatización de los mismos. Finalmente, después de optimizar y validar el método analítico, se ha aplicado a una serie de muestras de patatas fritas para establecer sus composiciones en ácidos grasos. Se han empleado dos de las variedades de patata más ampliamente utilizadas, *Hermes* y *Mustang*⁶¹, sometidas a un proceso de fritura industrial con dos lotes de aceites vegetales de similar composición. Por último, a partir de estas composiciones en ácidos grasos, se han aplicado herramientas de estadística descriptiva, como el ANOVA y el PCA para evaluar la influencia de los dos factores (variedad de patata y aceite vegetal empleado) en las muestras de patatas fritas.

5.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Se estudiaron una serie de FAME de los ácidos grasos más representativos, de longitudes de cadena entre 6 y 24 carbonos, saturados, mono y poliinsaturados, así como diferentes ácidos grasos ω -3, ω -6 y ω -9.

En la **Tabla 23** aparecen especificados los nombres de cada FAME con sus respectivas fórmulas moleculares **C_x:y(nz;catb)**, donde “**x**” es el número de átomos de carbono del ácido graso; “**y**” el número de insaturaciones del mismo; “**z**” la posición del primer doble enlace empezando a contar por el extremo metilo terminal (tipo de ácido graso omega que es); y “**a**”, “**b**” las posiciones convencionales de los dobles enlaces con estereoisomería cis “**c**” o trans “**t**”, omitidas de la fórmula en caso de poseer la molécula todos los dobles enlaces cis.

Tabla 23. Lista de FAME ordenados según el número creciente de átomos de carbono e insaturaciones.

Fórmula	Nombre científico	(Nombre Común)
C6:0	metil hexanoato	(metil caproato)
C8:0	metil octanoato	(metil caprilato)
C10:0	metil decanoato	(metil caprato)
C11:0	metil undecanoato	
C12:0	metil dodecanoato	(metil laurato)
C13:0	metil tridecanoato	
C14:0	metil tetradecanoato	(metil miristato)
C14:1(n5)	cis-9 metil tetradecenoato	(metil miristoleato)
C15:0	metil pentadecanoato	
C15:1(n5)	cis-10 metil pentadecenoato	
C16:0	metil hexadecanoato	(metil palmitato)
C16:1(n7)	cis-9 metil hexadecenoato	(metil palmitoleato)
C17:0	metil heptadecanoato	
C17:1(n7)	cis-10 metil heptadecenoato	
C18:0	metil octadecanoato	(metil estearato)
C18:1(n9)	cis-9 metil octadecenoato	(metil oleato)
C18:1(n9;t9)	trans-9 metil octadecenoato	(metil elaidato)
C18:2(n6)	cis,cis-9,12 metil octadecadienoato	(metil linoleato)
C18:2(n6;t9t12)	trans,trans-9,12 metil octadecadienoato	(metil linolelaidato)
C18:3(n3)	cis,cis,cis-9,12,15 metil octadecatrienoato	(metil (α-)linolenato)
C18:3(n6)	cis,cis,cis-6,9,12 metil octadecatrienoato	(metil γ-linolenato)
C20:0	metil eicosanoato	(metil araquidato)
C20:1(n9)	cis-11 metil eicosenoato	
C20:2(n6)	cis,cis-11,14 metil eicosadienoato	
C20:3(n3)	cis,cis,cis-11,14,17 metil eicosatrienoato	
C20:3(n6)	cis,cis,cis-8,11,14 metil eicosatrienoato	
C20:4(n6)	cis,cis,cis,cis-5,8,11,14 metil eicosatetraenoato	
C20:5(n3)	cis,cis,cis,cis,cis-5,8,11,14,17 metil eicosapentaenoato	
C21:0	metil heneicosanoato	
C22:0	metil docosanoato	(metil behenato)
C22:1(n9)	cis-13 metil docosenoato	(metil erucato)
C22:2(n6)	cis,cis-13,16 metil docosadienoato	
C22:6(n3)	cis,cis,cis,cis,cis,cis-4,7,10,13,16,19 metil docosahexaenoato	
C23:0	metil tricosanoato	
C24:0	metil tetracosanoato	(metil lignocerato)
C24:1(n9)	cis-15 metil tetracosenoato	(metil nervonato)

5.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

5.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL

- Equipo GC-MS 7890A (**Figura 1**, Capítulo III) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU).
- Columna capilar específica para análisis de ácidos grasos SP-2560 (100 m × 0.25 mm × 0.20 µm) de alta polaridad y relleno cianopropilsiloxano de Supelco (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EEUU).
- Molino universal M20, IKA (IKA-Werke; Staufen, Alemania).
- Balanza analítica de precisión KERN ABT 220-5DM (Balingen, Alemania).
- Batería de mantas calefactoras con 4 sistemas de extracción Soxhlet de 50 mL de capacidad, de JP Selecta S.A. (Barcelona, España).
- Baño de ultrasonidos Ultrasons de JP Selecta S.A.
- Evaporador rotatorio RE-111, con baño termostatado de agua 461 de Büchi (Flawil, Suiza) y bomba de vacío MZ 2C NT (Wertheim, Alemania).
- Sistema de concentración mediante arrastre con nitrógeno de 6 puertos, Alltech 9555 (Alltech Associates Inc., Lexington, KY, EEUU).
- Agitador mecánico Vibromatic 384-P, de JP Selecta S.A.
- Agitador vórtex REAX Control, Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Centrífuga de alta velocidad 5810R, de Eppendorf (Hamburg, Alemania).
- Estufa con un intervalo de temperaturas de trabajo entre 50 y 300 °C, Heraeus (Madrid, España).
- Micropipetas Eppendorf.
- Filtros de jeringa Cronus de nylon de 0.45 µm, de LabHut (Gloucester, Inglaterra).
- Cartuchos de extracción de celulosa de 10Ø × 50 mm de CHMLAB Group (referencia: F5800-10050; Barcelona, España)
- Material de uso general de laboratorio.

5.3.2. REACTIVOS Y PATRONES

- Helio calidad BIP y nitrógeno Premier X50S de Carbueros Metálicos (Barcelona, España).
- Diclorometano, cloroformo y hexano de calidad Pestiscan, suministrados por Labscan (Dublín, Irlanda).
- Éter dietílico y cloruro sódico para análisis de Panreac (Barcelona, España).
- Ácido clorhídrico 32% para análisis, de Merk (Darmstadt, Alemania).
- 1-propanol, de Fischer (Waldachtal, Alemania).

- Hidróxido potásico 1N en metanol y disolución de trifluoruro de boro en metanol al 14% de Fluka, (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO, EEUU).
- Agua ultrapura obtenida mediante los equipos Elix 5 y Compact Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).
- Mezcla de patrones S37 compuesta por 37 ésteres metílicos de ácidos grasos, 10mg/mL en diclorometano suministrados por Supelco (referencia 47885-u; Sigma-Aldrich Corporation).
- Patrones puros e individuales de 4 ésteres metílicos de ácidos grasos: C16:0, C18:0, C18:1(n9) y C18:2(n6), suministrados por Supelco.

5.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Se prepararon disoluciones madre de 1000 mg/L en diclorometano para cada uno de los cuatro patrones puros individuales a estudiar como compuestos mayoritarios (C16:0, C18:0, C18:1(n9), C18:2(n6)). A partir de ellas se preparó una disolución conjunta en diclorometano, conteniendo 100 mg/L de cada uno de ellos. Partiendo de ésta y por diluciones sucesivas con diclorometano, se prepararon las disoluciones de calibrado de acuerdo con el intervalo de linealidad.

Por otra parte, tomando la mezcla comercial S37 de 10000 mg/L se preparó una de 1000 mg/L en diclorometano. De la misma forma, a partir de ésta y por diluciones sucesivas con diclorometano, se prepararon las disoluciones necesarias para realizar las líneas de calibrado de acuerdo con los intervalos de linealidad.

Las disoluciones de patrones más concentradas se conservaron en congelador a -18 °C, estables durante un periodo de 6 meses. Las disoluciones de calibración se almacenaron en el frigorífico a +4 °C, todas ellas renovadas en un tiempo no superior a un mes para evitar pérdidas.

5.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

5.5.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para establecer las condiciones cromatográficas que permitieran la cuantificación de los analitos se partió de las descritas en un trabajo anterior del mismo grupo de investigación

TESEA⁴⁹, referente a análisis de FAME mediante GC-MS. A partir de ellas y realizando modificaciones en el programa de temperaturas y en el modo de trabajo del espectrómetro de masas, se establecieron finalmente las siguientes condiciones cromatográficas de trabajo:

- ✓ Gas portador: He, 1.1 mL/min.
- ✓ Volumen inyección: 1 µL.
- ✓ Temperatura del inyector: 250 °C.
- ✓ Inyección en modo *Pulsed Splitless* (sin división de flujo, con pulso de presión).
- ✓ Programa de temperatura del horno:

	Pendiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Inicialmente</i>		50	1
<i>Rampa 1</i>	6	205	17
<i>Rampa 2</i>	10	250	10

- ✓ Temperatura de la interfase: 310 °C.
- ✓ Temperatura de la fuente de iones: 240 °C.
- ✓ Temperatura del cuadrupolo: 180 °C.
- ✓ Registro de espectros de masas en modo SIM (seguimiento de iones específicos).

5.5.2. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Para llevar a cabo la identificación de los analitos de interés, se determinaron sus tiempos de retención por comparación con los patrones analizados en las mismas condiciones cromatográficas. El empleo de la librería de espectros *Wiley 7N* permitió confirmar la identificación de cada FAME, estableciendo su espectro de masas mediante la inyección de patrones en modo SCAN.

A partir de los espectros de masas se seleccionaron tres iones característicos de cada compuesto: el ión T y los dos iones Q₁, Q₂ de confirmación, para realizar la cuantificación en modo SIM. La selección de los iones se realizó aplicando dos criterios: suficiente selectividad (relación m/z elevada) y alta sensibilidad (iones más abundantes).

En la **Tabla 24** se muestran los compuestos estudiados ordenados por sus tiempos de retención así como los iones que se siguen en modo SIM y las abundancias relativas de los mismos. En la **Figura 19** aparece un ejemplo de un cromatograma de iones totales en modo SIM de una disolución mezcla de los 36 patrones de FAME en diferentes concentraciones: 10, 20 y 30 mg/L (dependiendo del analito).

Tabla 24. Lista de FAME identificados numerados por orden de elución, con sus tiempos de retención (t_r), ión mayoritario (T) e iones de confirmación (Q_1 , Q_2) y sus respectivas abundancias relativas (% Q_1 , % Q_2).

Nº	FAME	t_r (min)	T	Q_1	Q_2	% Q_1	% Q_2
1	C6:0	19.6	74.0	87.0	99.1	35.0	26.0
2	C8:0	22.8	74.0	87.1	127.1	48.0	18.0
3	C10:0	25.9	74.0	143.0	155.1	27.0	15.0
4	C11:0	27.3	74.0	157.1	169.1	18.0	16.0
5	C12:0	28.7	74.0	171.1	183.2	19.0	14.0
6	C13:0	30.1	74.0	185.2	228.3	23.0	9.0
7	C14:0	31.5	74.0	199.1	242.2	27.0	13.0
8	C14:1(n5)	32.7	55.1	166.1	208.2	30.0	29.0
9	C15:0	32.9	74.0	213.2	256.2	24.0	16.0
10	C15:1(n5)	34.1	55.0	222.1	254.2	29.0	8.0
11	C16:0	34.3	74.0	227.2	270.2	25.0	21.0
12	C16:1(n7)	35.5	55.1	236.2	268.3	47.0	10.0
13	C17:0	35.8	74.0	241.2	284.3	29.0	25.0
14	C17:1(n7)	37.1	55.1	250.2	282.2	50.0	10.0
15	C18:0	37.6	74.0	298.3	255.2	32.0	30.0
16	C18:1(n9;t9)	38.4	55.1	264.2	296.2	64.0	10.0
17	C18:1(n9)	38.8	55.1	264.2	296.2	59.0	10.0
18	C18:2(n6;t9t12)	39.9	67.1	294.3	263.2	34.0	20.0
19	C18:2(n6)	41.1	67.1	294.3	263.2	30.0	22.0
20	C20:0	42.0	74.0	326.4	283.3	39.0	27.0
21	C18:3(n6)	42.9	79.0	292.2	194.0	16.0	7.0
22	C20:1(n9)	43.7	55.0	292.3	324.4	67.0	8.0
23	C18:3(n3)	44.1	79.0	292.2	261.2	13.0	9.0
24	C21:0	44.7	74.0	340.3	297.2	66.0	39.0
25	C20:2(n6)	46.1	81.0	322.2	291.1	28.0	22.0
26	C22:0	46.9	74.0	354.4	311.3	66.0	37.0
27	C20:3(n6)	47.8	79.1	320.2	222.1	22.0	16.0
28	C22:1(n9)	48.3	55.1	320.3	352.4	91.0	9.0
29	C20:3(n3)	48.5	79.1	320.3	289.4	14.0	9.0
30	C20:4(n6)	48.8	79.0	150.0	203.0	25.0	11.0
31	C23:0	49.0	74.0	368.4	325.4	49.0	24.0
32	C22:2(n6)	50.4	67.1	350.3	319.2	28.0	27.0
33	C24:0	51.0	74.0	382.4	339.3	76.0	36.0
34	C20:5(n3)	51.3	79.0	91.0	201.1	89.0	8.0
35	C24:1(n9)	52.4	55.1	348.3	306.3	83.0	12.0
36	C22:6(n3)	56.6	79.1	119.0	199.1	44.0	6.0

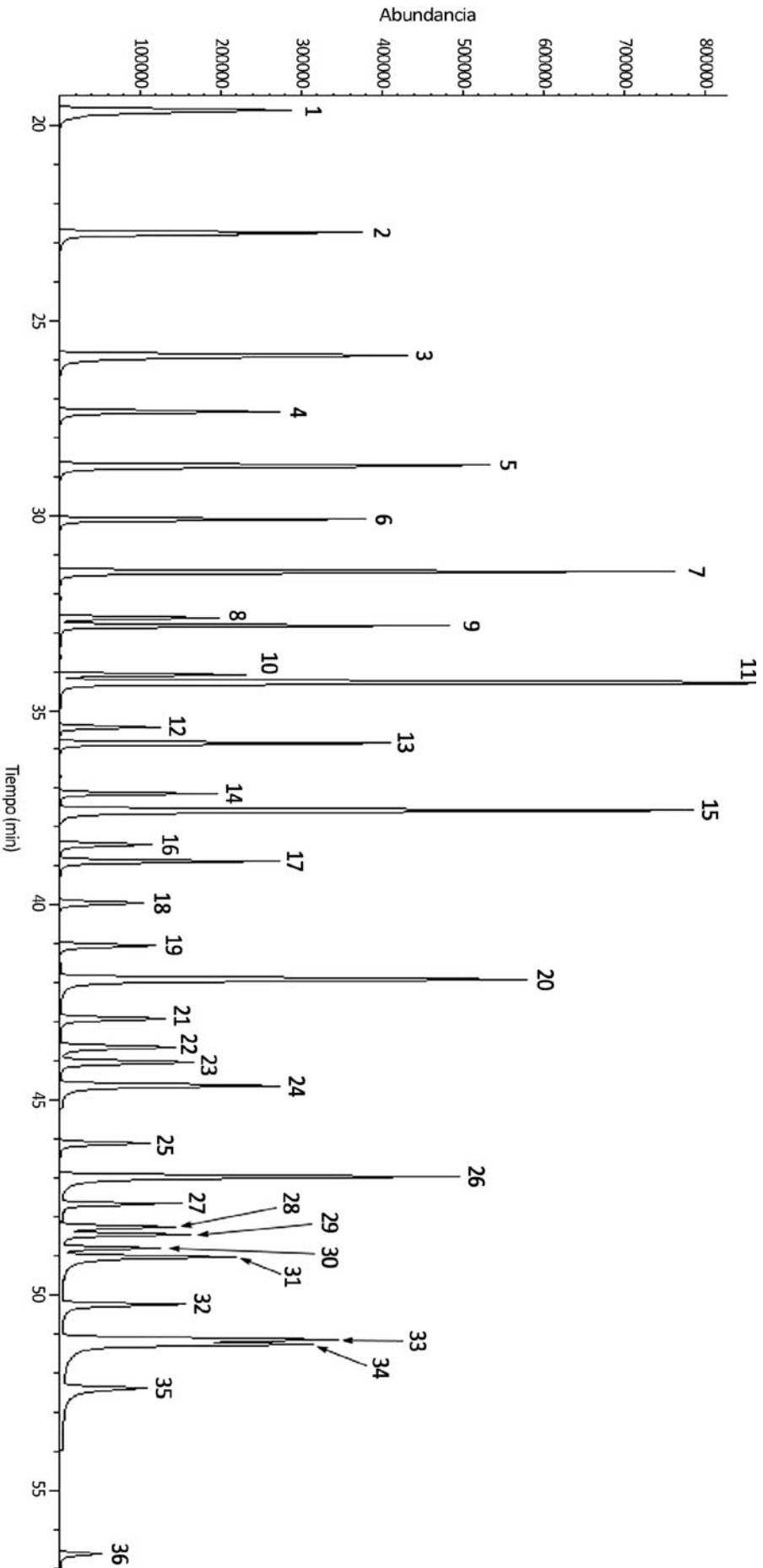


Figura 19. Cromatograma en modo SIM de una disolución de patrones de los 36 FAME en diclorometano. Los números corresponden a los FAME enumerados en la Tabla 24, cuyas concentraciones fueron de 10 mg/L (FAME: 4, 6, 8-10, 12-14, 16, 18-21, 23-29, 31-34, 36), 20 mg/L (FAME: 1-3, 5, 7, 15, 17, 22, 30, 35) y 30 mg/L (FAME: 11).

5.6. PROGRAMAS ESTADISTICOS

Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con los softwares *IBM SPSS Statistics* versión 20 (Statistical Package for the Social Sciences; Armonk, NY, EEUU) y *Statgraphics Centurión XVI* versión 16.1.03 (Statpoint Technologies; Warrenton, VA, EEUU).

El conjunto de datos obtenidos fueron sometidos a dos tratamientos de estadística descriptiva: ANOVA de dos vías y PCA.

5.7. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Para llevar a cabo la determinación del perfil de ácidos grasos de las muestras fueron necesarias dos etapas en el tratamiento de muestra. La primera de ellas consistió en un tratamiento de extracción de los ácidos grasos de la matriz de patata frita. Posteriormente se realizó una derivatización para transformarlos en ésteres metílicos de ácidos grasos, permitiendo así su separación mediante cromatografía de gases. Por tanto, para establecer el tratamiento de muestra se efectuó un estudio de cada una de esas dos etapas claves.

5.7.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Con el fin de obtener los perfiles más completos de ácidos grasos en patatas fritas, las muestras fueron sometidas a cuatro procedimientos de extracción sólido-líquido diferentes. Los cuatro estudios de extracción siempre se llevaron a cabo en las mismas condiciones, es decir, la misma variedad de patata frita, el mismo tratamiento derivatización⁴⁹, la misma cantidad de diclorometano para reconstituir el extracto seco final (1,5 mL) y el mismo método cromatográfico de separación e identificación; con el objetivo de comparar entre sí los resultados obtenidos en cada uno de ellos.

En la **Tabla 25** aparecen esquematizados los cuatro procedimientos de extracción de ácidos grasos evaluados. El primero de ellos consistió en una **modificación del procedimiento propuesto por Folch et al.**⁵⁸, basado en una extracción sólido-líquido con una mezcla de disolventes cloroformo/metanol 2:1 (v/v). Se realizaron dos extracciones pesando dos masas diferentes de muestra de patatas fritas (0.5 y 0.1 g). La muestra en cloroformo/metanol se agitó durante 10 min. El extracto se filtró y se aisló la fase orgánica inferior, lavándose con la mezcla de disolventes (2 veces con 1 mL) y adicionando 2 mL de disolución de cloruro sódico al 0.88%. A continuación, se centrifugó durante 5 min (1000×g, 20 °C), se separaron las fases y,

finalmente, la fase orgánica fue sometida a concentración eliminándose el disolvente orgánico mediante arrastre con corriente de nitrógeno.

Tabla 25. Procedimientos de extracción de ácidos grasos evaluados, con sus respectivas referencias bibliográficas (⁴⁹, ⁵⁸, ⁵⁹), tiempos relativos de extracción con el disolvente extractante utilizado y las etapas principales.

Procedimiento extracción	Referencia	Disolvente extractante	Tiempo extracción	Principales etapas
Modificación del método de Folch	<i>Li & Watkins, 2001</i> ⁵⁸	cloroformo/metanol 2:1 (v/v)	10 min	Extracción, filtración, lavado, centrifugación, separación de fases y concentración.
Digestión ácida	<i>Shahidi, 2001</i> ⁵⁹	ácido clorhídrico 6N	30 min	Hidrólisis, centrifugación, decantación, extracción con n-hexano, filtración y concentración.
Soxhlet con éter dietílico	<i>Jiménez et al., 2009</i> ⁴⁹	éter dietílico	4 h	Evaporación de disolvente, reconstitución y concentración.
Soxhlet con n-propanol/agua	<i>Shahidi, 2001</i> ⁵⁹	n-propanol/agua 3:1 (v/v)	4 h	Evaporación de disolvente, reconstitución y concentración.

El segundo procedimiento consistió en una **digestión ácida**⁵⁹. Se hidrolizaron previamente 0.5 g de muestra con ácido clorhídrico 6 N en un horno a 75 °C durante 30 min. A continuación, se separaron las fases por centrifugación durante 5 min (1000×g, 20 °C). Se decantó la fase líquida llevándose a un embudo de decantación para extraer los ácidos grasos con 5 mL (3 veces) de n-hexano. El extracto se filtró y, finalmente, se llevó a concentrar mediante corriente de nitrógeno.

Los dos últimos procedimientos se basaron en extracciones mediante **equipo Soxhlet** con **éter dietílico**⁴⁹ y mezcla de disolventes **n-propanol/agua 3:1 (v/v)**⁵⁹ como agentes extractantes. Para la extracción con éter dietílico se realizaron dos extracciones pesando dos masas diferentes de muestra de patatas fritas (0.5 y 0.1 g), mientras en el otro procedimiento únicamente se pesaron 0.5 g de muestra. Ambas extracciones se llevaron a cabo en un aparato Soxhlet en continuo durante 4 h, a la temperatura correspondiente al punto de ebullición de cada disolvente, aproximadamente 85 °C (n-propanol/agua) y 35 °C (éter dietílico). Después,

los disolventes se eliminaron en un rotavapor hasta sequedad. Seguidamente, las muestras se reconstituyeron en n-hexano y, finalmente, se concentraron mediante el sistema de arrastre con corriente de nitrógeno.

Los resultados, resumidos únicamente para cuatro FAME en la **Tabla 26**, se obtuvieron a dos niveles diferentes de concentración: 5 y 30 g/100g, para los FAME que aparecían en mayores concentraciones en las muestras y, 0.2 y 100 mg/100g, para los que lo hacían en menores concentraciones.

Tabla 26. Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar relativas (% RSD) (n=5) obtenidos al aplicar los cuatro procedimientos de extracción de ácidos grasos ensayados a dos niveles de concentración, 5g/100g y 30g/100g para aquellos FAME mayoritarios en las muestras; y 0.2mg/100g y 100mg/100g para los FAME minoritarios.

Procedimiento extracción	Muestra (g)	% Recuperación (%RSD)							
		FAME mayoritarios				FAME minoritarios			
		C16:0		C18:1(n9)		C14:0		C18:3(n3)	
		5g/100g	30g/100g	5g/100g	30g/100g	0.2mg/100g	100mg/100g	0.2mg/100g	100mg/100g
Modificación del método de Folch	0.5	66.8 (4.0)	68.1 (3.7)	69.5 (3.5)	68.5 (2.9)	72.5 (4.5)	71.7 (3.8)	78.2 (4.3)	80.1 (4.6)
	0.1	69.7 (2.7)	70.5 (3.1)	61.3 (2.1)	63.0 (2.4)	88.3 (6.1)	87.2 (5.4)	84.6 (9.2)	85.2 (8.6)
Digestión ácida	0.5	54.3 (10.5)	55.5 (9.8)	57.1 (7.4)	57.9 (8.0)	41.6 (12.6)	40.5 (13.2)	44.9 (8.5)	45.4 (9.0)
Soxhlet con éter dietílico	0.5	92.9 (2.0)	93.6 (1.8)	89.5 (0.9)	90.6 (1.2)	96.2 (2.6)	95.6 (2.2)	90.5 (3.8)	91.3 (3.3)
	0.1	76.0 (13.0)	77.1 (10.9)	67.8 (17.0)	68.8 (15.7)	80.9 (17.1)	82.1 (18.0)	78.2 (14.8)	79.1 (13.9)
Soxhlet con n-propanol/agua	0.5	35.5 (25.8)	34.7 (22.3)	44.8 (15.1)	45.8 (13.9)	54.1 (7.8)	53.1 (8.7)	42.4 (8.8)	44.1 (7.9)

En un principio, se desecharon los tratamientos de digestión ácida y extracción Soxhlet con n-propanol/agua, puesto que sus porcentajes de recuperación eran muy inferiores y además presentaban elevadas desviaciones estándar relativas (% recuperación<65%; % RSD=7-25) en

comparación con los obtenidos mediante la extracción con cloroformo/metanol y extracción Soxhlet con éter dietílico, como muestra la **Tabla 26**. Por esa razón, únicamente en estos dos últimos procedimientos se realizaron pruebas a dos niveles de concentración de muestra inicial (0.5 y 0.1 g).

Finalmente, de la comparación entre los dos tratamientos, se dedujo que el procedimiento que suministraba mejores porcentajes de recuperación con valores inferiores de desviaciones relativas y tiempos de preparación de muestra inferiores (debido principalmente al menor número de etapas y la sencillez de las mismas), era el **tratamiento de extracción Soxhlet** con éter dietílico, **aplicado a 0.5 g de muestra**. Además, cabe destacar que a pesar de que la extracción sólido-líquido consumía mucho menos disolvente, en el proceso de concentración de muestra en posterior a la extracción Soxhlet se podía recuperar el éter dietílico.

5.7.2. DERIVATIZACIÓN A ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRASOS

El procedimiento de derivación se evaluó mediante el análisis de una sola variedad de patata frita y manteniendo constantes el resto de condiciones, al igual que para el estudio de la extracción de ácidos grasos. El tratamiento se basó en la derivatización de Morrison & Smith⁶², es decir, utilizando los reactivos derivatizantes KOH 1N en metanol y catalizador ácido BF₃ al 14% en metanol, pero modificando algunos de los parámetros del método descrito.

Las condiciones iniciales seleccionadas fueron las utilizadas en publicaciones anteriores del propio grupo de investigación TESEA^{41,49,51}, ya que ofrecían buenos resultados. La temperatura y tiempo de derivatización en el horno junto con el volumen de diclorometano necesario para reconstituir el extracto seco, fueron los parámetros que se modificaron con el fin de obtener las condiciones óptimas. El estudio de la influencia de cada parámetro en el análisis de FAME se llevó a cabo variando uno de ellos mientras los otros permanecían constantes. La temperatura del horno se ensayó a tres temperaturas (90, 95 y 100 °C), el tiempo derivatización del horno se estudió en un intervalo entre 5 y 30 min (intervalos de 5 min) y el volumen de diclorometano se evaluó entre 0.5 y 2.0 mL (intervalos de 0.5 mL).

Comparando los resultados obtenidos, se concluyó que la derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos en el horno a 100 °C durante 5 min, utilizando posteriormente un volumen de 1.5 mL de diclorometano para reconstituir el extracto proporcionaba, además de

porcentajes de recuperación ligeramente superiores, tiempos de derivatización notablemente más cortos.

5.7.3. MÉTODO PROPUESTO

El método propuesto para llevar a cabo el tratamiento de muestra consistió en una primera etapa de extracción de ácidos grasos mediante equipo Soxhlet con éter dietílico, seguida de una derivatización a ésteres metílicos con KOH y catalizador BF_3 , en metanol. La **Figura 20** muestra el esquema del método propuesto, descrito a continuación.

Se pesaron 0.5 g de muestra de patata frita, previamente molida hasta conseguir un tamaño homogéneo, en un cartucho de extracción de celulosa. A continuación, la muestra se introdujo en el cuerpo del Soxhlet, añadiendo al sistema 90 mL de éter dietílico para realizar la extracción en continuo a la temperatura de ebullición del disolvente, durante 4h. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el disolvente por concentración en rotavapor hasta sequedad. Seguidamente, el extracto fue disuelto y transferido a un tubo de vidrio de 15 mL con ayuda de 6 mL de n-hexano, el cual fue eliminado totalmente mediante el sistema de concentración mediante corriente de nitrógeno.

A continuación, se llevó a cabo la etapa de derivatización que comenzó con la hidrólisis de los ácidos grasos, añadiendo al extracto de ácidos grasos 1 mL de KOH 1N en metanol y llevándolo al horno a 100 °C durante 5 min. Después de enfriada la muestra, se añadió 1 mL de BF_3 al 14% en metanol, calentándose en el horno nuevamente a 100 °C durante 5 min. Posteriormente y una vez fría la muestra, se adicionaron 2 mL de hexano y 8.5mL de agua desionizada, útiles para favorecer el lavado y la aparición de dos fases: La mezcla se agitó durante 10min e inmediatamente después se centrifugó durante 5 min ($1000\times g$; 20 °C). A continuación, se extrajo la fase orgánica, que contenía los ésteres metílicos, filtrándose a través de un filtro de nylon ($0.45\ \mu\text{m}$) y recogiendo en un vial de 2 mL. Finalmente, se eliminó el n-hexano con el sistema de arrastre mediante corriente de nitrógeno, reconstituyéndose el extracto de ésteres metílicos en 1.5 mL de diclorometano.

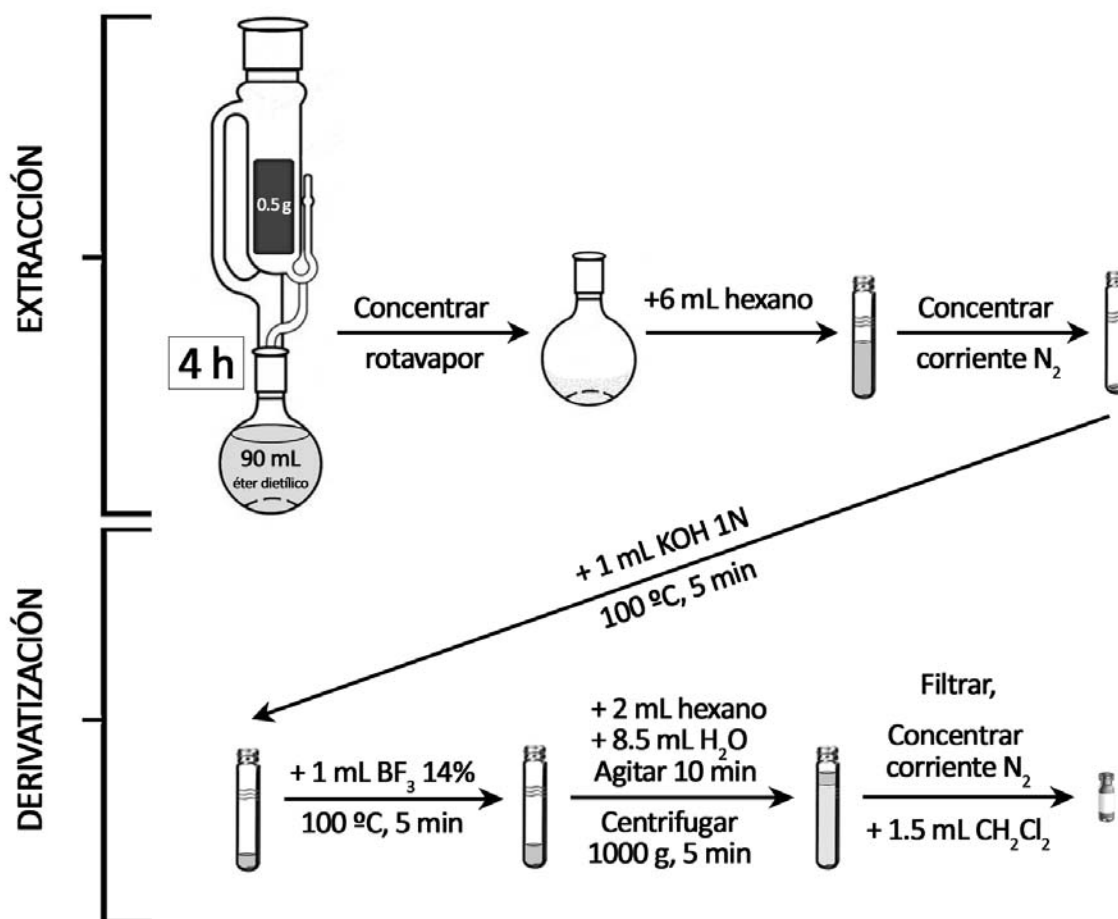


Figura 20. Esquema del método propuesto para el tratamiento de muestra formado por dos etapas: extracción de ácidos grasos de la muestra y derivatización a ésteres metílicos.

5.8. CUANTIFICACIÓN

La cuantificación de los 36 analitos no fue posible a través de un calibrado matriz-patrón, puesto que en este tipo de matrices siempre había presencia de ácidos grasos. Por tanto, se optó por realizar la cuantificación de los compuestos mediante una calibración por patrón externo, utilizando los patrones disueltos en diclorometano, comprobando previamente que no existía un efecto matriz en la determinación de los ácidos grasos.

En el proceso de identificación y cuantificación se observaron grandes diferencias en cuanto a la presencia de determinados FAME en las muestras de patatas fritas, como se muestra en la **Figura 21**, por lo que los analitos se dividieron en dos grupos:

- ↪ **FAME mayoritarios:** C16:0, C18:0, C18:1(n9) y C18:2(n6).
- ↪ **FAME minoritarios:** los treinta y dos FAME restantes.

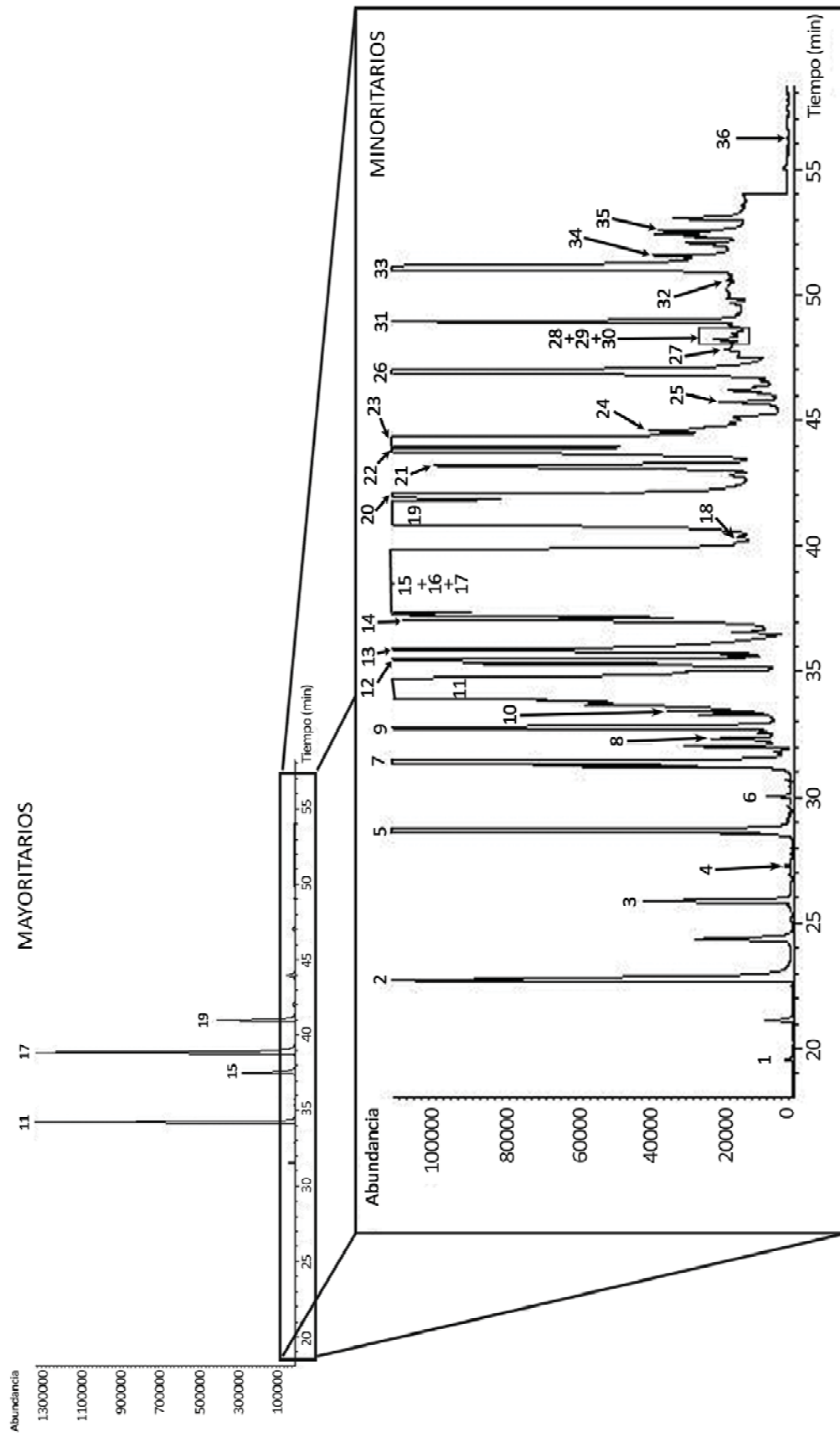


Figura 21. Cromatograma de una muestra de patata frita *Hermes* con aceite 2. Los FAME mayoritarios están identificados en el cromatograma superior (muestra sometida a dilución 1:400) y los minoritarios en la ampliación del propio cromatograma (muestra con dilución 1:4). Los números corresponden a los FAME según la Tabla

Por tanto, fue necesario diluir todas las muestras tratadas antes de analizarlas. Se realizó una primera dilución 1:4 de los 1.5 mL de extracto final para poder analizar y cuantificar el grupo de FAME minoritarios. A partir de esa dilución, se preparó otra muestra más diluida, concretamente 1:400, específica para cuantificar los FAME mayoritarios.

5.9. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La validación del método se realizó teniendo en cuenta las directrices de la Comisión Internacional de Armonización (ICH)⁶³, en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, exactitud y precisión.

5.9.1. LINEALIDAD

Se estudió el posible efecto matriz, con el fin de comprobar si era posible emplear las curvas de calibrado por patrón externo para determinar FAME en muestras de patatas fritas. Se realizó una comparación de las pendientes de las líneas de calibrado obtenidas mediante patrón externo, con las pendientes obtenidas adicionando concentraciones conocidas de patrones a una muestra real de patatas fritas sometida al tratamiento de muestra desarrollado, obtenidas para seis niveles de concentración, y por duplicado, entre 30g/100g (FAME mayoritarios) y 0.01mg/100g (FAME minoritarios).

Como ejemplo, en la **Figura 22** se muestra una comparación de ambas pendientes con su intervalo de confianza, para el FAME C18:2(n6). Los intervalos de confianza de ambas pendientes se superponían, por lo que se pudo deducir que la matriz no tenía ningún efecto sobre la señal de los analitos y que era posible emplear el calibrado por patrón externo para cuantificar FAME en patatas fritas.

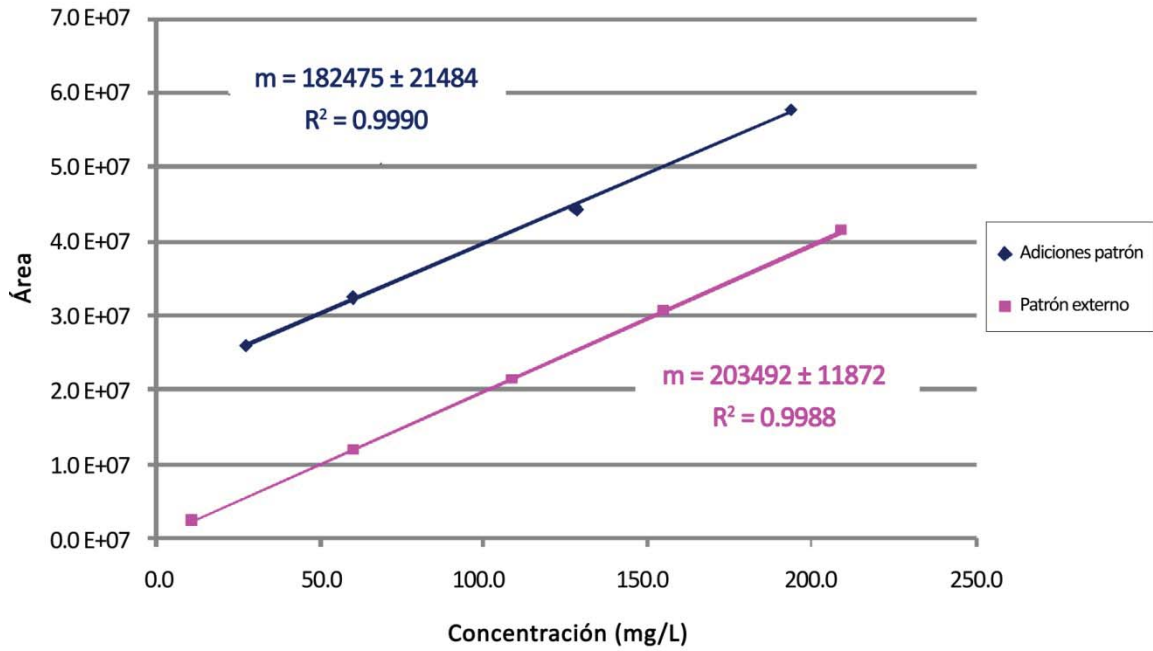


Figura 22. Gráfica de comparación de pendientes de las líneas de calibrado mediante adiciones patrón y por patrón externo, para el C18:2(n6) en la muestra de patata frita *Mustang* con aceite vegetal 1.

La **Tabla 27** muestra los valores de las ecuaciones de las líneas de calibrado por patrón externo para los 36 FAME. La linealidad se evaluó a partir de las mismas curvas de calibración obtenidas por regresión lineal por mínimos cuadrados a partir de la respuesta del ión mayoritario (T) para cada uno de los analitos estudiados. Los gráficos obtenidos mostraban líneas rectas, con una intersección no significativamente diferente de cero ($p < 0,05$), en todo el intervalo estudiado ($R^2 \geq 0,99$).

Tabla 27. Parámetros de la regresión (pendiente y R^2), límites de detección (LOD), cuantificación (LOQ) y repetibilidad de los 36 FAME estudiados (n=5) para la variedad de patata frita *Mustang* con aceite 1.

FAME		Parámetros regresión		Límites (mg/100g)		Repetibilidad (n=5)	
Nº	Mayoritarios	Pendiente	R^2	LOD	LOQ	Concentración (g/100g)	RSD (%)
11	C16:0	657670	0.9985	0.12	0.40	3.52	0.2
15	C18:0	655184	0.9967	0.13	0.42	1.36	2
17	C18:1(n9)	194502	0.9947	0.65	2.1	25.3	0.1
19	C18:2(n6)	203492	0.9988	0.43	1.4	4.84	0.5
Nº	Minoritarios	Pendiente	R^2	LOD	LOQ	Concentración (mg/100g)	RSD (%)
1	C6:0	836596	0.9979	0.01	0.02	0.03	7
2	C8:0	473915	0.9969	0.08	0.3	7.34	5
3	C10:0	1221267	0.9933	0.06	0.2	3.10	4
4	C11:0	1233815	0.9948	0.01	0.04	0.14	3
5	C12:0	1291932	0.9953	0.09	0.3	8.44	4
6	C13:0	1277773	0.9947	0.01	0.02	0.05	1
7	C14:0	1362089	0.9992	0.08	0.3	115	4
8	C14:1(n5)	489550	0.9992	0.03	0.09	3.24	0.9
9	C15:0	1367981	0.9993	0.07	0.2	8.79	5
10	C15:1(n5)	546595	0.9973	0.1	0.3	26.8	1
12	C16:1(n7)	416950	0.9967	0.09	0.3	20.5	2
13	C17:0	1274223	0.9967	0.08	0.3	7.39	0.9
14	C17:1(n7)	442127	0.9991	0.1	0.4	5.51	0.2
16	C18:1(n9;t9)	393889	0.9995	0.1	0.4	25.6	0.5
18	C18:2(n6;t9t12)	439113	0.9989	0.09	0.3	< LOQ	< LOQ
20	C20:0	1032503	0.9997	0.1	0.5	58.9	0.1
21	C18:3(n6)	427997	0.9970	0.1	0.3	22.5	0.1
22	C20:1(n9)	382390	0.9982	0.1	0.4	26.1	0.1
23	C18:3(n3)	537912	0.9964	0.3	0.9	255	0.3
24	C21:0	901757	0.9973	0.06	0.2	0.75	2
25	C20:2(n6)	397873	0.9976	0.08	0.3	1.67	0.08
26	C22:0	848183	0.9978	0.2	0.8	106	0.4
27	C20:3(n6)	388462	0.9983	0.05	0.2	0.75	0.05
28	C22:1(n9)	313767	0.9976	0.1	0.4	0.70	2
29	C20:3(n3)	462020	0.9981	0.06	0.2	< LOQ	< LOQ
30	C20:4(n6)	422275	0.9985	0.02	0.09	0.19	2
31	C23:0	763669	0.9980	0.05	0.2	4.70	2
32	C22:2(n6)	352145	0.9954	0.01	0.03	0.07	7
33	C24:0	713670	0.9976	0.06	0.2	63.0	0.8
34	C20:5(n3)	467841	0.9969	0.01	0.02	< LOQ	< LOQ
35	C24:1(n9)	226888	0.9934	0.09	0.3	< LOQ	< LOQ
36	C22:6(n3)	325067	0.9981	0.04	0.1	0.17	0.7

5.9.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Los límites de detección y de cuantificación se determinaron experimentalmente en muestras de patatas fritas para cada FAME como 3 y 10 veces la relación señal/ruido, respectivamente. La **Tabla 27** muestra los valores correspondientes para una de las variedades de patatas fritas estudiadas (*Mustang*), en la cual han sido calculados estos límites, cuyos resultados fueron comparables para la otra variedad (*Hermes*).

Los límites de detección para los FAME minoritarios estaban comprendidos entre 0.01 y 0.3 mg/100g, mientras que los límites de cuantificación englobaban valores entre 0.02 y 0.9 mg/100g. En cuanto a los FAME mayoritarios, éstos fueron más altos, abarcando un intervalo entre 0.12-0.65 mg/100g y 0.40-2.1 mg/100g para los límites de detección y cuantificación respectivamente.

5.9.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN

La precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad, en términos de desviación estándar relativa (% RSD). Se cuantificaron tanto los ácidos grasos mayoritarios como minoritarios, llevándose a cabo la preparación de la muestra y su cuantificación por quintuplicado.

Los resultados para una de las muestras de patatas fritas (*Mustang*) se muestran en la **Tabla 27**. Todas las desviaciones estándar relativas obtenidas, incluyendo los resultados de precisión de la variedad *Hermes*, fueron inferiores a un 10%, por lo que el método propuesto se consideró preciso.

Por otro lado, para evaluar la exactitud del método, se comparó la cuantificación mediante el método propuesto de una serie de muestras reales, con una cuantificación de las mismas muestras mediante el método de adiciones patrón. Como ejemplo, se muestra en la **Tabla 28** los resultados obtenidos para 4 de los analitos estudiados (2 FAME mayoritarios y 2 minoritarios) en una de las muestras analizadas (*Hermes*). Puesto que el resto de resultados, tanto en la misma variedad de patata frita como en la otra (*Mustang*) fueron comparables, se pudo afirmar que el método propuesto además de ser preciso era exacto.

Tabla 28. Comparación de concentraciones e intervalos de confianza (IC), de 4 FAME, entre los métodos de patrón externo y adiciones patrón, para la variedad de patata *Hermes* con aceite 2.

FAME		Patrón externo		Adiciones patrón	
Mayoritarios	Concentración media (g/100g)	IC (g/100g)	Concentración media (g/100g)	IC (g/100g)	
C16:0	3.17	± 0.03	3.20	± 0.04	
C18:1(n9)	23.50	± 0.04	23.52	± 0.03	
Minoritarios	Concentración media (mg/100g)	IC (mg/100g)	Concentración media (mg/100g)	IC (mg/100g)	
C14:0	72.1	± 0.2	71.9	± 0.4	
C18:3(n3)	294	± 4	289	± 6	

5.10. APLICACIÓN DEL MÉTODO

Un total de 28 muestras de diferentes patatas fritas, obtenidas directamente después del proceso de fritura y proporcionadas gentilmente por Facundo S.A. (Palencia, España), fueron analizadas. Todas ellas pertenecían a dos variedades de patata diferentes, *Hermes* y *Mustang*. Además, se emplearon dos lotes de una mezcla similar de aceites vegetales para freír las patatas: aceite vegetal 1, compuesto por una mezcla de aceite de oliva/aceite de girasol 80:20 (v/v) y aceite vegetal 2, compuesto por una mezcla 82:18 (v/v). Cada una de las 28 muestras se analizaron por triplicado en un tiempo no superior a 48 h después de realizada la toma de muestras.

5.11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.11.1. DETERMINACIÓN DE FAME EN MUESTRAS DE PATATAS FRITAS

El método optimizado y validado se aplicó al análisis de 28 muestras de patatas fritas con el fin de identificar y cuantificar en cada una de ellas los 36 ácidos grasos estudiados. La **Tabla 29** muestra las concentraciones medias (n=7) junto con los intervalos de confianza ($\alpha=0.05$) de cada analito en cada una de las muestras, agrupadas por variedad (*Hermes* y *Mustang*) y teniendo en cuenta el aceite de fritura usado en cada caso (aceite vegetal 1 y aceite vegetal 2).

Los resultados de la **Tabla 29** se utilizaron para establecer los perfiles de ácidos grasos para cada tipo de patata frita, además de para obtener interpretaciones tanto nutricionales como estadísticas.

Tabla 29. Concentraciones medias e intervalos de confianza (IC; $\alpha=0.05$) de los 36 ácidos grasos para las muestras de patatas fritas agrupadas en función de la variedad de patata y el aceite utilizado (H: *Hermes*; M: *Mustang*; 1: aceite vegetal 1; 2: aceite vegetal 2).

FAME	Concentración media \pm IC (g/100g)				
	Mayoritarios	H 1	H 2	M 1	M 2
C16:0		3.80 \pm 0.06	3.17 \pm 0.03	3.52 \pm 0.01	3.48 \pm 0.01
C18:0		1.73 \pm 0.02	2.08 \pm 0.01	1.36 \pm 0.04	1.40 \pm 0.01
C18:1(n9)		23.0 \pm 0.1	23.5 \pm 0.1	25.3 \pm 0.1	25.0 \pm 0.1
C18:2(n6)		4.81 \pm 0.02	5.08 \pm 0.01	4.84 \pm 0.04	4.68 \pm 0.02
FAME	Concentración media \pm IC (mg/100g)				
Minoritarios	H 1	H 2	M 1	M 2	
C6:0	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.03 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	
C8:0	18.5 \pm 0.2	7.57 \pm 0.12	7.34 \pm 0.55	6.52 \pm 0.05	
C10:0	3.53 \pm 0.09	1.98 \pm 0.04	3.10 \pm 0.20	1.59 \pm 0.10	
C11:0	0.14 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	
C12:0	5.93 \pm 0.16	23.9 \pm 0.2	8.44 \pm 0.57	25.0 \pm 1.0	
C13:0	0.03 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02	< LOQ ^a	
C14:0	130 \pm 1	72.1 \pm 0.2	115 \pm 8	93.9 \pm 0.5	
C14:1(n5)	< LOQ ^b	< LOQ ^b	3.24 \pm 0.05	3.85 \pm 0.09	
C15:0	9.51 \pm 0.11	10.1 \pm 0.1	8.79 \pm 0.70	9.90 \pm 0.67	
C15:1(n5)	37.7 \pm 0.2	27.7 \pm 0.6	26.8 \pm 0.5	23.1 \pm 1.2	
C16:1(n7)	27.2 \pm 0.3	1.26 \pm 0.01	20.5 \pm 0.6	2.67 \pm 0.18	
C17:0	8.77 \pm 0.20	2.98 \pm 0.13	7.39 \pm 0.10	4.20 \pm 0.15	
C17:1(n7)	4.78 \pm 0.12	6.80 \pm 0.11	5.51 \pm 0.15	5.51 \pm 0.13	
C18:1(n9;t9)	20.0 \pm 0.1	24.0 \pm 0.6	25.6 \pm 0.2	24.8 \pm 0.3	
C18:2n(6;t9t12)	6.37 \pm 0.02	6.96 \pm 0.12	< LOQ ^c	6.74 \pm 0.35	
C18:3(n6)	24.9 \pm 0.1	16.0 \pm 0.1	22.5 \pm 0.6	14.4 \pm 2.8	
C18:3(n3)	279 \pm 1	295 \pm 4	255 \pm 14	257 \pm 4	
C20:0	67.0 \pm 0.1	83.2 \pm 0.8	58.9 \pm 0.3	90.6 \pm 1.4	
C20:1(n9)	25.7 \pm 0.2	24.0 \pm 1	26.1 \pm 0.5	27.4 \pm 1.7	
C20:2(n6)	1.62 \pm 0.01	2.23 \pm 0.02	1.67 \pm 0.04	1.60 \pm 0.2	
C20:3(n6)	0.80 \pm 0.01	0.84 \pm 0.01	0.75 \pm 0.04	0.49 \pm 0.02	
C20:3(n3)	< LOQ ^d	< LOQ ^d	< LOQ ^d	< LOQ ^d	
C20:4(n6)	< LOQ ^b	< LOQ ^b	0.19 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	
C20:5(n3)	< LOQ ^a	< LOQ ^a	< LOQ ^a	< LOQ ^a	
C21:0	0.66 \pm 0.01	3.3 \pm 0.2	0.75 \pm 0.02	0.81 \pm 0.02	
C22:0	98.5 \pm 0.4	151 \pm 1	106 \pm 1	181 \pm 1	
C22:1(n9)	0.68 \pm 0.01	1.8 \pm 0.1	0.70 \pm 0.02	0.53 \pm 0.04	
C22:2(n6)	0.04 \pm 0.01	0.1 \pm 0.1	0.07 \pm 0.01	0.1 \pm 0.1	
C22:6(n3)	0.15 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	
C23:0	3.88 \pm 0.05	10.5 \pm 0.2	4.70 \pm 0.15	3.44 \pm 0.10	
C24:0	59.0 \pm 0.4	68.8 \pm 1.2	63.0 \pm 0.8	62.6 \pm 0.5	
C24:1(n9)	0.37 \pm 0.01	1.2 \pm 0.1	< LOQ ^c	0.82 \pm 0.02	

^a LOQ < 0.02mg/100g. ^b LOQ < 0.09mg/100g. ^c LOQ < 0.3mg/100g. ^d LOQ < 0.2mg/100g

Los resultados fueron consistentes con los esperados a partir de un aceite vegetal de fritura típico^{39,47}, cuyos ácidos grasos más comunes son C18:1(n9), C18:2(n6), C16:0 y C18:0. También se pudo encontrar presencia de otros ácidos grasos de los aceites en bajas concentraciones en las patatas fritas, como C12:0, C14:0, C16:1(n7), C18:3(n3), C20:0, C20:1(n9) y C22:0.

En general, los alimentos con menor contenido en ácidos grasos son más beneficiosos en términos nutricionales. La **Tabla 30** muestra algunos de los grupos de ácidos grasos más relevantes en cuanto al aspecto de la salud y nutrición humana. Aparecen especificadas, en cada variedad de patata, las concentraciones totales de ácidos grasos y los porcentajes de cada grupo de ácidos grasos más importantes: saturados, trans, ω -3, ω -6, ω -9 y relación omega 6/omega 3 (ω -6/ ω -3). En general, se concluyó que la variedad de patata *Hermes* contenía cantidades totales de ácidos grasos menores y con relaciones ω -6/ ω -3 inferiores, por lo tanto cabría esperar que su consumo moderado fuera menos perjudicial para la salud. Sin embargo, estos beneficios no compensarían por poseer mayores porcentajes de ácidos grasos trans y saturados, en comparación con la variedad *Mustang*.

Tabla 30. Concentraciones y porcentajes de masa medios de los diferentes grupos de ácidos grasos más relevantes en la nutrición humana, en las variedades de patatas fritas estudiadas. (H: *Hermes*; M: *Mustang*; 1: aceite vegetal 1; 2: aceite vegetal 2).

Muestra	Ácidos grasos						
	g/100g			%			Relación
	C _{total}	Saturados	trans	ω -3	ω -6	ω -9	ω -6/ ω -3
H 1	34.2	17.4	0.08	0.82	14.2	67.4	17.4
H 2	34.7	16.4	0.09	0.85	14.7	67.9	17.3
M 1	35.8	14.7	0.07	0.71	13.6	70.8	19.0
M 2	35.4	15.1	0.09	0.73	13.3	70.7	18.3

C_{total}: concentración total de ácidos grasos en cada muestra de patatas fritas.

5.11.2. ANÁLISIS DE VARIANZA

Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías para evaluar si la variedad de patata, el aceite de fritura o la interacción entre ambos factores tuvieron una influencia significativa en el contenido de ácidos grasos de las muestras analizadas.

La **Tabla 31** muestra los factores o interacciones que presentan diferencias significativas (p -valor <0.05) mediante asteriscos. Con respecto a los ácidos grasos mayoritarios, se encontraron diferencias significativas para C18:0 y C18:1(n9) en términos de la variedad de patata e interacción patata-aceite, y para C16:0 únicamente en la interacción patata-aceite.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas respecto a la variedad de patata o el aceite vegetal de fritura en 9 y 4 los ácidos grasos minoritarios, respectivamente; mientras que se observaron efectos significativos debidos a la interacción patata-aceite en 15 ácidos grasos minoritarios. El mayor número de diferencias encontradas para los FAME minoritarios pudo ser debido al hecho de que los aceites vegetales no tenían una composición tan homogénea para los minoritarios como para los ácidos grasos mayoritarios. Sin embargo, pudo concluirse que el aceite vegetal empleado para la fritura era un factor influyente en los perfiles de ácidos grasos de patatas fritas. Además, también se concluyó que el mayor número de diferencias significativas en el contenido final de ácidos grasos de las diferentes muestras analizadas se debía principalmente a la variedad de patata.

Tabla 31. Efectos significativos (*) (p-valor < 0.05) de las variables estudiadas en función de la variedad de patata, el aceite vegetal de fritura y la interacción entre ambos factores.

Variable	Factor		
	Patata	Aceite vegetal	Patata · Aceite
C6:0	*		*
C8:0	*		*
C10:0			
C11:0			
C12:0		*	*
C13:0			
C14:0		*	*
C14:1(n5)			
C15:0			
C15:1(n5)	*		
C16:0^a			*
C16:1(n7)	*		*
C17:0			*
C17:1(n7)		*	*
C18:0^a	*		*
C18:1(n9;t9)	*		*
C18:1(n9)^a	*		*
C18:2(n6;t9t12)			
C18:2(n6)^a			
C20:0			*
C18:3(n6)			
C20:1(n9)	*		*
C18:3(n3)	*		*
C21:0	*		*
C20:2(n6)			
C22:0			*
C20:3(n6)	*		*
C22:1(n9)			
C20:3(n3)			
C20:4(n6)			
C23:0			
C22:2(n6)		*	*
C24:0			
C20:5(n3)			
C24:1(n9)			
C22:6(n3)			

^a FAME mayoritarios.

5.11.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Una vez realizados los análisis de varianza y comprobadas las diferencias significativas para las muestras en función de la variedad de patata y el aceite de fritura, el siguiente paso en la interpretación de los resultados pasó por llevar a cabo una visión global de los mismos. Teniendo en cuenta el elevado número de variables puestas en juego, la herramienta estadística adecuada para la interpretación de los datos era el PCA.

En primer lugar, se comprobó la idoneidad del análisis estadístico mediante el *test de esfericidad de Barlett*. La significación obtenida permitió considerar la matriz de correlaciones adecuada para la aplicación de un PCA para describir los datos.

En la **Tabla 32** se representan los valores propios y el porcentaje de varianza explicada por cada componente principal extraído para los autovalores mayores de la unidad. Además, se llevó a cabo una rotación de las componentes para hacer más sencilla la interpretación de los pesos de las variables en las componentes, ya que se maximizaban los pesos de las variables en algunas componentes, mientras que para el resto se minimizaban. El método de rotación empleado fue la normalización *Varimax con Kaiser*.

Tabla 32. Autovalores iniciales y varianza total explicada en un análisis de componentes principales con rotación varimax.

Componente	Autovalores iniciales			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% varianza	% acumulado	Total	% varianza	% acumulado
1	16.161	44.891	44.891	12.013	33.371	33.371
2	7.440	20.668	65.558	7.441	20.670	54.041
3	4.906	13.628	79.186	7.158	19.884	73.924
4	3.719	10.330	89.517	4.180	11.611	85.535

Método de extracción: Análisis de Componentes Principales
Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

Según muestra la **Tabla 32**, mediante las dos primeras componentes principales se explicaba un 54.0 % de la variabilidad de los datos originales, mientras que para las cuatro primeras componentes la variabilidad alcanzaba un 85.5 %, por lo que, reduciendo la dimensionalidad de los datos de 36 variables a 4 componentes no se perdía prácticamente nada de la información aportada por los datos originales.

En la **Figura 23** se muestran los pesos para cada variable en las dos primeras componentes principales (**Figura 23a**) y en la tercera y cuarta componentes (**Figura 23b**). Las dos primeras componentes estaban definidas por los FAME: C22:2(n6), C12:0, C22:0, C18:3(n6) y C16:0; y C22:1(n9), C21:0 y C20:2(n6), respectivamente. Todas ellas explicaban un 54% de la variabilidad de los datos originales. Con respecto a la tercera y cuarta componentes, quedaron definidas principalmente por los FAME: C18:2(n6;t9t12), C18:1(n9) y C18:2(n6), C20:1(n9), respectivamente; variables que explicaban algo más de un 31% de la variabilidad original de los datos.

Una vez seleccionadas las cargas o variables más importantes, se calcularon las puntuaciones de cada muestra en cada componente. La **Figura 24** representa las puntuaciones de las muestras de patatas fritas analizadas, etiquetadas según la variedad de patata (*Hermes*: marrón; *Mustang*: amarillo) y el aceite de fritura (aceite vegetal 1: cuadrado; aceite vegetal 2: círculo).

Como puede observarse en la **Figura 24a**, de la representación en las dos primeras componentes principales, no había una distribución clara de las puntuaciones de acuerdo con la variedad de patata. Sin embargo, se observaban mayores diferencias entre las muestras de patatas fritas analizadas tomándose en consideración el aceite de fritura. Esta situación podría explicarse por el hecho de que C16:0, uno de los componentes mayoritarios del aceite de freír y, por consiguiente, de las muestras de patatas fritas, además de ser una variable con bastante peso en la primera componente principal, presentaba diferentes valores para los dos lotes de aceite estudiados, a pesar de que los dos aceites vegetales eran similares. Sin embargo, como se confirmó, una pequeña variación podría provocar diferencias en las puntuaciones para la componente segunda, según el tipo de aceite.

Por otra parte, al representar la tercera y cuarta componentes principales, se observó una clara diferenciación entre las dos variedades de patata, como muestra la **Figura 24b**. Esta diferenciación, debida a mayores puntuaciones de las muestras pertenecientes a la variedad *Mustang* con respecto a la *Hermes*, se asoció principalmente a dos de los ácidos grasos mayoritarios que presentaban cargas altas en las componentes 3 y 4, C18:1(n9) y C18:2(n6).

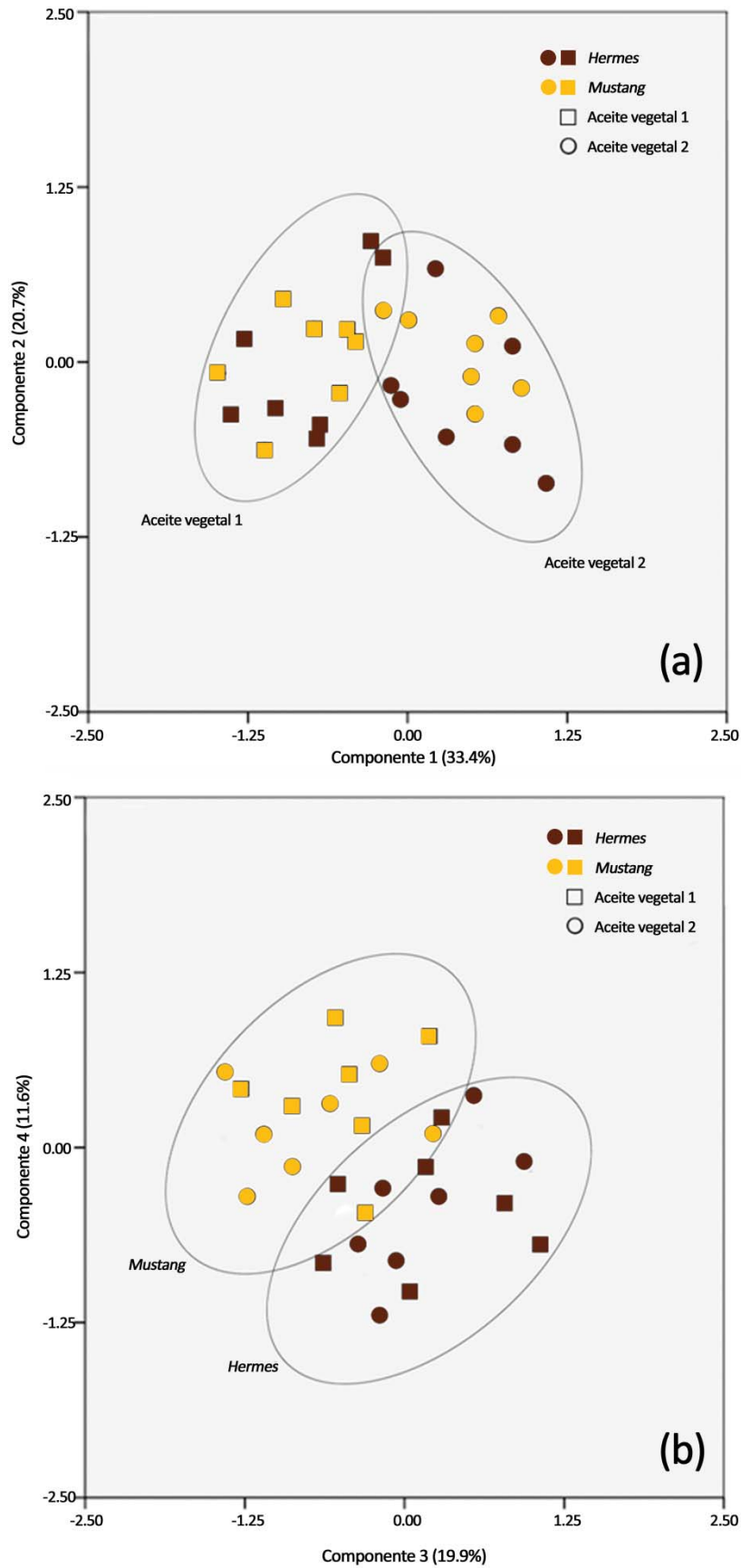


Figura 24. Puntuaciones para las muestras de patatas fritas en las componentes (a) primera y segunda y (b) tercera y cuarta; etiquetadas según la variedad de patata y el aceite vegetal utilizado en su fritura.

5.12. CONSECUENCIAS

Se ha puesto a punto y validado un método para el análisis de 36 ácidos grasos en muestras de patatas fritas, mediante GC-MS.

El tratamiento de muestra que ha proporcionado los mejores resultados en términos de porcentajes de recuperación y tiempo de preparación ha consistido en una extracción Soxhlet con éter dietílico seguida de una etapa de derivatización de los ácidos grasos a ésteres metílicos con KOH y BF₃.

El método propuesto se ha aplicado a 28 muestras de dos variedades de patata diferentes (*Mustang* y *Hermes*), elaboradas con 2 aceites vegetales de fritura de similar composición (aceite vegetal 1: aceite oliva/aceite girasol 80:20 (v/v); y aceite vegetal 2: mezcla 82:18 (v/v)).

Se ha observado que los ácidos grasos mayoritarios en las muestras de patatas fritas fueron C18:0, C16:0, C18:2(n6) y C18:1(n9).

Se han obtenido mayores concentraciones totales de ácidos grasos y relaciones ω -6/ ω -3 superiores para las muestras de patatas fritas pertenecientes a la variedad *Mustang*. Sin embargo, sus porcentajes en ácidos grasos trans y, sobre todo, saturados, son menores que para la variedad *Hermes*.

Mediante análisis de varianza se ha demostrado que la variedad de patata causa más diferencias significativas (11) que el lote de aceite vegetal utilizado para la fritura (4), en términos de contenido de ácidos grasos. De hecho, la interacción entre ambos factores ha proporcionado más diferencias significativas (18), especialmente para los ácidos grasos minoritarios.

Igualmente se ha establecido, por medio de un análisis de componentes principales, la existencia de grupos de muestras similares desde el punto de vista del contenido en ácidos grasos, en función, principalmente, de la variedad de patata y, en menor medida, en función del aceite vegetal empleado en el proceso de fritura.

5.13. BIBLIOGRAFÍA

- ³⁸ K.H. Wagner, E. Plasser, C. Proell, S. Kanzler. *Comprehensive studies on the trans fatty acid content of Austrian foods: convenience products, fast food and fats*. Food Chemistry, 108 (2008) 1054-1060.
- ³⁹ P.M. Fernández-San Juan. *Fatty acid composition of commercial Spanish fast food and snack food*. Journal of Food Composition and Analysis, 13 (2000) 275-281.
- ⁴⁰ Norma UNE-EN 14103:2011. *Productos derivados de aceites y grasas. Ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Determinación de los contenidos de éster y de éster metílico de ácido linolénico*. AEN/CTN 34 - Productos Alimentarios (2011).
- ⁴¹ P. Manzano, E. Arnáiz, J.C. Diego, L. Toribio, C. García-Viguera, J.L. Bernal, J. Bernal. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with capillary flow modulation to separate FAME isomers*. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 4952-4959.
- ⁴² N. Aldai, M. de Renobales, L.J.R. Barron, J.K.G. Kramer. *What are the trans fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced trans fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements*. European Journal of Lipid Science and Technology, 115 (2013) 1378-1401.
- ⁴³ W. Suwannakood, C. Patarapanich, L. Tongyongk. *Analysis of trans fatty acid content in snacks and non-dairy creamers by attenuated total reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Journal of Health Research, 26 (2012) 35-39.
- ⁴⁴ J.V. Kadamne, C.L. Castrodale, A. Proctor. *Measurement of conjugated linoleic acid (CLA) in CLA-rich potato chips by ATR-FTIR spectroscopy*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (2011) 2190-2196.
- ⁴⁵ A. Kita, G. Lisinska, G. Golubowska. *The effects of oils and frying temperatures on the texture and fat content of potato crisp*. Food Chemistry, 102 (2007) 1-5.
- ⁴⁶ G.A. Ooko, J.N. Kabira. *Suitability of three newly released Kenyan potato varieties for processing into crisps and French fries*. African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development, 11 (2011) 5266-5281.
- ⁴⁷ A. Sanches-Silva, A. Rodríguez-Bernaldo de Quirós, J. López-Hernández, P. Paseiro-Losada. *Comparison between high-performance liquid chromatography and gas chromatography methods for fatty acid identification and quantification in potato crisps*. Journal of Chromatography A, 1032 (2004) 7-15.
- ⁴⁸ S. Hauff, W. Vetter. *Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids*. Analytica Chimica Acta, 636 (2009) 229-235.
- ⁴⁹ J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. Nozal, L. Toribio, J. Bernal. *Profile and relative concentrations of fatty acids in corn and soybean seeds from transgenic and isogenic crops*. Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 7288-7295.

- ⁵⁰ Y. Zu, S. Zhang, Y. Fu, W. Liu, Z. Liu, M. Luo, T. Efferth. *Rapid microwave-assisted transesterification for the preparation of fatty acid methyl esters from the oil of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge)*. *European Food Research and Technology*, 229 (2009) 43-49.
- ⁵¹ L. Toribio, J.L. Bernal, M.J. Nozal, E. Arnáiz, J. Bernal. *Sequential supercritical fluid extraction of lipids. Application to the obtention of the fatty acid profile of some genetically modified varieties of corn*. *Food Analytical Methods*, 4 (2011) 196-202.
- ⁵² L. Hejazi, D. Ebrahimi, M. Guilhaus, D.B. Hibbert. *Determination of the composition of fatty acid mixtures using GCxFL-MS: a comprehensive two-dimensional separation approach*. *Analytical Chemistry*, 81 (2009) 1450-1458.
- ⁵³ M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, J. Bernal. *Multidimensional chromatography in food analysis*. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 7110-7129.
- ⁵⁴ M. Adahchour, J. Beens, U.A.Th. Brinkman. *Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1186 (2008) 67-108.
- ⁵⁵ H. G. Janssen, H. Steenbergen, S. de Koning. *The role of comprehensive chromatography in the characterization of edible oils and fats*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (2009) 1171-1184.
- ⁵⁶ J. Folch, M. Lees, G.H.S. Stanley. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. *Journal of Biological Chemistry*, 226 (1957) 497-509.
- ⁵⁷ E.G. Bligh, W.J. Dyer. *A rapid method of total lipid extraction and purification*. *Canadian Journal of biochemistry and physiology*, 37 (1959) 911-917.
- ⁵⁸ Y. Li, B.A. Watkins. *Analysis of fatty acids in food lipids*. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Wiley Online Library. (2001) D1.2.1-D1.2.15.
- ⁵⁹ F. Shahidi. *Extraction and measurement of total lipids*. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Wiley Online Library. (2001) D1.1.1-D1.1.11.
- ⁶⁰ K. Pedneault, P. Angersa, A. Gosselina, R.J. Tweddell. *Fatty acid profiles of polar and neutral lipids of ten species of higher basidiomycetes indigenous to eastern Canada*. *Mycological Research*, 112 (2008) 1428-1434.
- ⁶¹ *Potato varieties physico-chemical characteristics*. Agrico UK Limited (2009) (01-04-2014).
<http://www.agrico.co.uk/products/varieties/mustang.aspx>
<http://www.agrico.co.uk/products/varieties/hermes.aspx>
- ⁶² W.R. Morrison, L.M. Smith. *Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol*. *Journal of Lipid Research*, 5 (1964) 600-608.

- ⁶³ ICH (International Conference on Harmonisation). *Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2 (R1)*. ICH Harmonised Tripartite Guideline, Geneva **(2005)**.

**SEPARACIÓN DE ÉSTERES METÍLICOS DE
ÁCIDOS GRASOS MEDIANTE GC×GC-FID**

6.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha señalado en el capítulo anterior, los ácidos grasos son elementos nutricionales importantes para los seres vivos. El organismo puede sintetizar muchos ácidos grasos. Sin embargo, aquellos que no pueden ser sintetizados en cantidades adecuadas deben ser obtenidos de la dieta, y se denominan ácidos grasos esenciales (EFA). Dentro de los EFA, las dos familias más representativas son los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3 y ω -6, cuyos ácidos grasos más característicos son el (α -) linolénico (C18:3(n3)) y el linoléico (C18:2(n6)), respectivamente.

El interés que generan los ácidos grasos, reflejado en los numerosos trabajos de investigación llevados a cabo, principalmente relacionados con la salud y la alimentación, puede ser debido a su influencia directa en la salud humana; no sólo a nivel del metabolismo como un acumulador de energía, o por su participación en las membranas biológicas y en la acilación de proteínas⁶⁴, sino también porque pueden influir positiva o negativamente en una serie de enfermedades tales como hipertensión, hipotrigliceridemia, enfermedades coronarias del corazón y cardiovasculares, cáncer, etc^{64,65}.

Por otra parte, en los últimos años se está dando cada vez más importancia al aprovechamiento de subproductos agrícolas, marinos, de la industria agroalimentaria y de las cadenas de distribución de alimentos, así como de la biomasa urbana. Este interés se debe principalmente al hecho de que se generan anualmente toneladas de residuos cuya eliminación habitualmente supone un elevado coste sumado al de producción. En cambio, su valorización reduciría el impacto ambiental y facilitaría la obtención de determinados principios activos, aditivos y materias primas que podrían ser utilizados en otras actividades empresariales: farmacéutica, química, industria agroalimentaria, abonos orgánicos y alimentación animal, entre otros.

Los subproductos más utilizados con estos fines han sido sobre todo residuos de frutas y verduras⁶⁶. Dentro de ellos, uno de los cultivos que ha suscitado el interés por desarrollar una utilidad alternativa de sus subproductos ha sido el brócoli (hojas, tallos, etc.). Las pellas o floretes del brócoli constituyen la parte del vegetal más apreciada pero sólo representan el 25 % de la planta, lo cual da lugar a un 75 % de material vegetal sin utilidad alimentaria, ganadera o industrial con un importante impacto medioambiental, a pesar de que puedan tener una composición similar a las partes comestibles de la planta. Por ello, el conocimiento de su

composición fitoquímica ha sugerido un gran potencial de aprovechamiento de sus subproductos como fuente de ingredientes y compuestos bioactivos, promotores de la salud y nutrientes de gran valor⁶⁷⁻⁶⁹. Por tanto, en este estudio se ha buscado verificar también la composición de ácidos grasos de las hojas de brócoli para su posible conversión en productos alimentarios biofortificados con un valor añadido o con características nutraceuticas.

Como ya se ha explicado en el capítulo anterior, para la determinación de ácidos grasos de cualquier matriz es necesario llevar a cabo un tratamiento de muestra basado en una primera etapa de extracción de los lípidos de la propia matriz. Las técnicas más utilizadas son las extracciones sólido-líquido o líquido-líquido tradicionales, como el Soxhlet, u otras más modernas y automatizables que evitan el uso de tal cantidad de disolventes⁷⁰. Algunas de ellas son la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción acelerada con disolventes (ASE), la extracción ultrasónica con disolventes (USE) y la extracción con fluidos supercríticos (SFE). De todas ellas, la técnica más favorable y más empleada para obtener extractos de alimentos limpios y enriquecidos en determinados analitos de interés es la SFE⁷¹.

El fluido supercrítico más ampliamente utilizado es el dióxido de carbono (CO₂) puesto que no posee ni una temperatura ni una presión críticas excesivamente elevadas (31.3 °C y 73.8 bar), su reactividad química es baja y puede ser separado de los extractos fácilmente.

En cuanto al posterior análisis de los ácidos grasos, basándonos también en el capítulo anterior, la técnica utilizada tradicionalmente ha sido la GC, empleando tanto detectores FID^{69,70} como MS^{48,49,70}. La utilización de otras técnicas cromatográficas para separar e identificar ácidos grasos, como son HPLC⁷⁰ y de fluidos supercríticos (SFC)⁷², prácticamente no se han empleado con este fin.

Por este motivo, una vez extraídos los ácidos grasos se realiza una etapa de derivatización que, en este caso, consiste en una esterificación a sus FAME catalizada en medio ácido o básico, siendo el hidróxido potásico (KOH) en metanol con catalizador trifluoruro de boro (BF₃) el procedimiento más empleado^{48,49,51,58} (capítulo V).

Sin embargo, a medida que aumenta la complejidad de las muestras a analizar y el número de analitos a determinar, incluso utilizando las columnas de líquidos iónicos disponibles actualmente en equipos GC-MS, resulta complicado lograr una total separación de todos los compuestos, especialmente si se trata de isómeros geométricos⁷³⁻⁷⁵.

Por ello, la tendencia actual, sobre todo en relación con el análisis de alimentos, está más enfocada hacia la separación y determinación mediante técnicas multidimensionales de cromatografía de gases (MDGC)⁵³. Estas técnicas MDGC han surgido como posibles alternativas para resolver algunas de las limitaciones en el análisis de muestras complejas de la técnica GC convencional, principalmente debido a su mayor poder de resolución. Concretamente, la más utilizada es la GC×GC^{55,76-81}, donde la muestra se separa en dos columnas cromatográficas de diferente naturaleza, conectadas en serie, de forma que todo el efluente de la primera columna (primera dimensión, ¹D) se transfiere a la segunda (segunda dimensión, ²D) gracias a un sistema de transferencia o modulador^{53,55,82}. Además, la GC×GC proporciona cromatogramas en dos y tres dimensiones (2D y 3D) útiles, por un lado, para identificar analitos desconocidos a través de tendencias, por ejemplo, en series homólogas de compuestos, como lo son los FAME; y, por otra parte, para determinar analitos de forma rápida y sencilla, gracias a la creación y aplicación de plantillas de referencia⁸³⁻⁸⁵.

En GC×GC, la selección de las dos columnas para conectar en serie es muy importante. Las combinaciones de columnas se organizan en dos tipos, dependiendo del grado de ortogonalidad⁸²: ortogonalidad convencional, con combinaciones apolar × polar; y ortogonalidad inversa, cuyas columnas están colocadas de forma opuesta, es decir, polar × apolar. Experimentalmente, se han empleado todas las combinaciones para la separación de diferentes grupos de FAME. Además, se han utilizado de forma conjunta ambos sistemas, con el fin de aprovechar plenamente las ventajas proporcionadas por cada uno de ellos e identificar el mayor número de compuestos mediante la comparación de ambos cromatogramas complementarios^{53,55}.

También, el modulador es un punto clave de la GC×GC. Se han desarrollado muchos sistemas basados en diferentes principios. En general, se clasifican en dos categorías principales: moduladores térmicos⁷⁷⁻⁷⁹ y de válvulas. Dentro de estos últimos, el modulador de flujo capilar (CFT)^{80,81}, desarrollado en 2006 por Seeley *et al.*⁸⁶, se está convirtiendo en la mejor alternativa frente a los moduladores criogénicos, ampliamente utilizados para GC×GC, por su facilidad de manejo, sin necesidad de usar líquidos criogénicos y por su robustez.

Los sistemas de detección más utilizados con esta técnica GC×GC⁵⁴ han sido el FID (GC×GC-FID)^{54,76,77,80} y el de espectrometría de masas, sobre todo, el de tiempo de vuelo (GC×GC-TOF)^{53,54,76,87}. Otros detectores, como el de captura de electrones (ECD), también se han

empleado en esta técnica pero para la determinación de otros analitos y no de FAME en alimentos.

Por todo ello, el objetivo fundamental de este trabajo ha consistido en explotar la utilidad de un sistema GC×GC-FID equipado con un modulador CFT, basado en microfluídica, para lograr la mejor separación cromatográfica de FAME, incluyendo dos grupos de isómeros de EFA, como son los ácidos linoléico y linolénico. Para ello, se han estudiado diferentes combinaciones de columnas modificando, tanto la ortogonalidad, como la naturaleza y longitud de la segunda dimensión, con el fin de encontrar el set de columnas cuya optimización proporcionase las mejores separaciones y resoluciones en 2D de todos los compuestos estudiados. Por último, el método GC×GC-FID propuesto se ha empleado para determinar la composición de ácidos grasos de una serie de muestras de hojas de brócoli liofilizadas y sometidas a un tratamiento de extracción de ácidos grasos mediante SFE, de tres variedades diferentes (*Naxos*, *Nubia* y *Viola*), a través de la creación y aplicación de una plantilla de referencia.

6.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Se han estudiado los FAME de los ácidos grasos naturales más característicos cuyas longitudes de cadena comprenden entre 6 y 24 carbonos: saturados, mono y poliinsaturados, algunos de ellos clasificados dentro de los grupos de ácidos grasos ω -3, ω -6, ω -9; con especial interés en dos grupos de isómeros, del ácido linoléico y del ácido linolénico.

En la **Tabla 23** (capítulo V) y la **Tabla 33** aparecen especificados todos los FAME estudiados, con sus respectivas fórmulas moleculares **C_x:y(nz;catb)**.

Tabla 33. Lista de los isómeros de la familia C18 estudiados, ordenados según el número creciente de átomos de carbono e insaturaciones.

Fórmula	Nombre científico	(Nombre Común)
C18:1(n7)	cis-11 metil octadecenoato	(cis-metil vaccenato)
C18:1(n12)	cis-6 metil octadecenoato	(metil petroselinato)
C18:2(n6) ^a	cis,cis-9,12 metil octadecadienoato	(metil linoleato)
C18:2(n6;c9t12) ^a	cis, trans-9,12 metil octadecadienoato	
C18:2(n6;t9c12) ^a	trans,cis-9,12 metil octadecadienoato	
C18:2(n6;t9t12) ^a	trans,trans-9,12 metil octadecadienoato	(metil linoleaidato)
C18:3(n3) ^b	cis,cis,cis-9,12,15 metil octadecatrienoato	(metil (α-)linolenato)
C18:3(n3;c9c12t15) ^b	cis,cis,trans-9,12,15 metil octadecatrienoato	
C18:3(n3;c9t12c15) ^b	cis,trans,cis-9,12,15 metil octadecatrienoato	
C18:3(n3;t9c12c15) ^b	trans,cis,cis-9,12,15 metil octadecatrienoato	
C18:3(n3;c9t12t15) ^b	cis,trans,trans-9,12,15 metil octadecatrienoato	
C18:3(n3;t9c12t15) ^b	trans,cis,trans-9,12,15 metil octadecatrienoato	
C18:3(n3;t9t12c15) ^b	trans,trans,cis-9,12,15 metil octadecatrienoato	
C18:3(n3;t9t12t15) ^b	trans,trans,trans-9,12,15 metil octadecatrienoato	

^a: 4 isómeros del ácido linoléico. ^b: 8 isómeros del ácido (α-) linolénico.

6.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

6.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL

- Equipo GCxGC-FID 7890A (**Figura 2**, capítulo III) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU).
- Equipo de extracción con fluidos supercríticos (SFE) diseñado por el grupo de investigación (**Figura 25**). Sistema modular formado por:
 - ⇒ 2 bombas de doble pistón Jasco PU-1586 (Jasco Corporation, Tokio, Japón) para impulsar el CO₂ y el modificador orgánico.
 - ⇒ Baño termostático modelo Frigomix U de B. Braun (Melsungen, Alemania) para enfriar la cabeza de la bomba de CO₂.
 - ⇒ Restrictor modelo BP-1580-81, de Jasco Corporation.
 - ⇒ Horno modelo Jasco CO-2056 Plus, equipado con dos válvulas 7000 Rheodyne (V3, V4 en **Figura 25**) (Cotati, California, EEUU) y dos válvulas (V1, V2) NV-5272 NOVA Swiss (Cesson, Francia) para trabajar en modo estático o dinámico.
 - ⇒ Celda de extracción (1 mL) de Jasco Corporation.
 - ⇒ Colector de fracciones Gilson 233XL (Villiers-le-Bel, Francia).

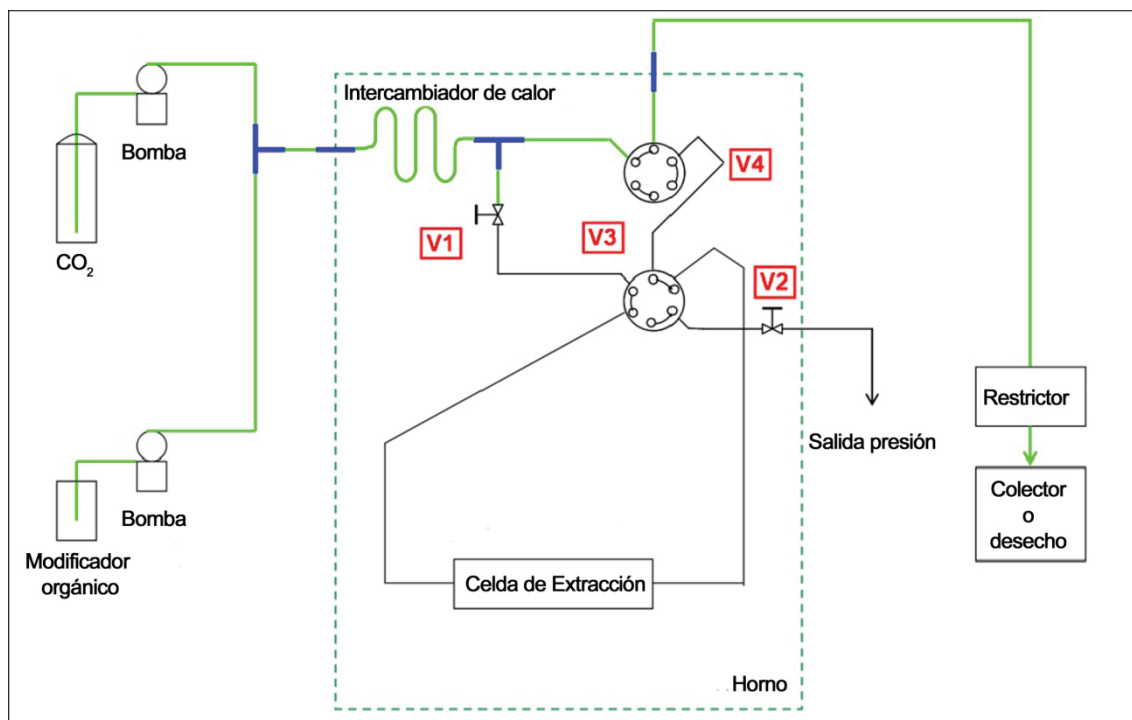


Figura 25. Esquema del equipo de extracción con fluidos supercríticos.

- Balanza analítica de precisión KERN ABT 220-5DM (Balingen, Alemania).
- Baño de ultrasonidos Ultrasons de JP Selecta S.A. (Barcelona, España).
- Agitador vórtex REAX Control, Heidolph (Schwabach, Alemania).
- Estufa con un intervalo de temperaturas de trabajo entre 50 y 300 °C, Heraeus (Madrid, España).
- Sistema de concentración mediante arrastre con nitrógeno de 6 puertos, Alltech 9555 (Alltech Associates Inc., Lexington, Kentucky, EEUU).
- Micropipetas Eppendorf, AG (Hamburg, Alemania).
- Material de uso general de laboratorio.

6.3.2. REACTIVOS Y PATRONES

- Hidrógeno, nitrógeno y aire, calidad Premier X50S de Carbueros Metálicos (Barcelona, España).
- Diclorometano, metanol y hexano de calidad Pestiscan, obtenidos de Labscan (Dublín, Irlanda).
- Hidróxido potásico 1N en metanol y disolución de trifluoruro de boro en metanol al 14%, de Fluka (Sigma-Aldrich Corporation, Misuri, EEUU).

- Agua ultrapura obtenida mediante los equipos Elix 5 y Compact Milli-Q de Millipore (Massachusetts, EEUU).
- Mezcla de isómeros, ésteres metílicos del ácido linoléico, 10 mg/mL en diclorometano, de Supelco (referencia 47791; Sigma-Aldrich Corporation). Consta de 4 isómeros geométricos indicados con el superíndice ^a en la **Tabla 33**.
- Mezcla de isómeros, ésteres metílicos del ácido linoléico, 10 mg/mL en diclorometano, de Supelco (referencia 47792; Sigma-Aldrich Corporation). Consta de 8 isómeros geométricos, señalados con el superíndice ^b en la **Tabla 33**.
- Mezcla de patrones S37 compuesta por 37 ésteres metílicos de ácidos grasos, 10 mg/mL en diclorometano, suministrados por Supelco (referencia 47885-u).
- 2 Kits de 10 (ME10-1KT) y 14 (ME14-1KT) patrones puros de ésteres metílicos individuales de cadena saturada e insaturada, respectivamente, de Supelco.

6.3.3. COLUMNAS

Se dispuso de un total de 9 columnas capilares para establecer las diferentes combinaciones de columnas:

- Columna apolar *DB-5MS* (5% fenilarilen-95% metilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de J&W Scientific, Agilent Technologies.
- 3 columnas apolares *ZB-5MS* de diferentes longitudes 2, 5 y 10 m (5% fenilarilen-95% dimetilpolisiloxano, 0.25 mm × 0.25 μm) de Zebron, Phenomenex (California, EEUU).
- 3 columnas de polaridad intermedia *ZB-35* de diferentes longitudes 2, 5 y 10 m (35% fenil-65% dimetilpolisiloxano, 0.25 mm × 0.25 μm) de Zebron, Phenomenex.
- Columna de polaridad alta *HP-INNOWax*, (100% polietilenglicol, 5 m × 0.25 mm × 0.15 μm) de J&W Scientific, Agilent Technologies.
- Columna de polaridad alta *BPX 70*, (70% cianopropil-30% polisilfenilensiloxano, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), de SGE Analytical Science (Victoria, Australia).

6.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Se prepararon disoluciones madre de 1000 mg/L utilizando diclorometano como disolvente, tanto de los patrones puros individuales como de las mezclas comerciales. A partir de ellas se prepararon: una disolución conjunta y disoluciones de trabajo individuales de cada uno de los patrones puros individuales, todas ellas en diclorometano, conteniendo 10mg/L de cada uno de ellos.

Las disoluciones de patrones más concentradas se conservaron en congelador a -18°C , mientras que las disoluciones de trabajo se almacenaron en el frigorífico a $+4^{\circ}\text{C}$, permaneciendo estables al menos durante 1 mes.

6.5. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

Para realizar una adecuada evaluación de los diferentes parámetros que influían en las separaciones mediante cromatografía bidimensional se evaluó, en primer lugar, qué combinación de columnas proporcionaba las mejores separaciones cromatográficas en dos dimensiones.

Para ello, se tuvo en cuenta que la separación cromatográfica mediante cromatografía bidimensional estaba fundamentalmente influenciada por cuatro parámetros: el programa de temperatura del horno, los flujos de gas portador en ambas dimensiones y el tiempo de modulación. Después de realizar pruebas preliminares se encontró que, tanto los flujos de gas portador en las dos columnas como el periodo de modulación, mostraron una fuerte influencia sobre la separación de los FAME.

El procedimiento para estudiar la influencia de cada uno de los parámetros más importantes en la separación de FAME, consistió en la modificación de uno de ellos manteniendo el resto constantes. El criterio utilizado para determinar las condiciones óptimas de separación de éteres metílicos fue encontrar la mejor separación entre la totalidad de los 47 FAME, pero prestando especial atención en la obtención de la mejor separación y resolución en 2D entre los picos de los dos grupos de mezclas de isómeros (ácidos linoléico, $\text{C}_{18}:2(\text{n}6)$, y linolénico, $\text{C}_{18}:3(\text{n}3)$).

Por tanto, se optimizaron principalmente estos cuatro parámetros, utilizando los patrones de ésteres metílicos, estableciéndose las condiciones finales del método cromatográfico en cada una de las combinaciones de columnas estudiadas.

Las condiciones cromatográficas de partida fueron aquellas utilizadas previamente en el análisis de FAME por GC convencional⁴⁹, añadiendo valores por defecto de aquellos parámetros específicos de cromatografía bidimensional. De forma que, exceptuando los cuatro

parámetros cromatográficos a estudiar, el resto de condiciones cromatográficas de trabajo fueron las siguientes:

- ✓ Volumen inyección: 1 µL.
- ✓ Temperatura del inyector: 250 °C.
- ✓ Inyección en modo *Pulsed Splitless* (sin división de flujo, con pulso de presión).
- ✓ Presión del pulso de inyección: 31 psi hasta 0.75 min.
- ✓ Flujo de purga hacia la válvula de venteo: 50 mL/min para 0.75 min.
- ✓ Flujo de purga del septum: 3 mL/min.
- ✓ Flujo de ahorro de gas: 15 mL/min después de 2 min.
- ✓ Temperatura del FID: 260 °C.
- ✓ Flujo de hidrógeno en el FID: 20 mL/min.
- ✓ Flujo de aire en el FID: 450 mL/min.
- ✓ Flujo de nitrógeno (*make-up*) en el FID: 25 mL/min.
- ✓ Frecuencia de adquisición de datos: 200Hz/.001min.

6.5.1. ESTUDIO DE DIFERENTES SETS DE COLUMNAS

Las 9 columnas utilizadas se combinaron según se indica en la **Tabla 34**, para determinar adecuadamente qué set de columnas producía los mejores resultados en el sistema GC×GC. Por una parte, se emplearon dos tipos de combinaciones de columnas atendiendo a la ortogonalidad: set de ortogonalidad convencional, compuesto por una primera columna apolar seguida de una segunda polar (*Set 1*); y sets de ortogonalidad inversa, donde se invirtió el orden de las columnas, primero una columna de mayor polaridad, seguida de una columna apolar o de menor polaridad (*Set 2 – Set 7*). Por otro lado, se estudió la influencia de la naturaleza y la longitud de la segunda columna, de 2 a 10 m, en las separaciones cromatográficas con combinaciones de ortogonalidad inversa (*Set 2 – Set 7*).

Tabla 34. Combinaciones de columnas utilizadas en el estudio de la separación de compuestos e isómeros de FAME.

Combinación	Ortogonal	Ortogonal inversa					
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 7
Columna ¹D	DB-5MS				BPX-70		
Columna ²D	HP-INNOWAX		ZB-5MS			ZB-35	
Longitud	5 m	2 m	5 m	10 m	2 m	5 m	10 m

Se probaron, una a una y de forma independiente, las 7 combinaciones de columnas mostradas en la **Tabla 34**, variando los parámetros más influyentes hasta conseguir en cada una de ellas la mejor separación y resolución en 2D de los FAME estudiados, especialmente para las dos mezclas de isómeros del ácido linoléico y linolénico.

La **Tabla 35** muestra los valores finales de los 4 parámetros cromatográficos para cada uno de los sets de columnas ensayados.

Tabla 35. Valores óptimos de los parámetros más influyentes en GC×GC para las 7 combinaciones de columnas estudiadas.

Parámetro GC×GC	Intervalo estudiado	Valor óptimo						
		Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 7
Flujo ¹ D (mL/min)	0.4 – 1.0	0.7	0.5	0.6	0.6	0.5	0.5	0.6
Flujo ² D (mL/min)	10 – 25	18	12	22	24	15	20	22
Modulación (s)	1.40 – 2.00	1.50	1.40	1.70	1.70	1.50	1.70	1.70
Programa temperatura horno		120°C	120°C	120°C	120°C	120°C	150°C	160°C
		220°C	230°C	220°C	230°C	230°C	230°C	230°C
		2°C/min	2°C/min	2°C/min	2°C/min	3°C/min	3°C/min	3°C/min
		260°C(10min) 10°C/min	260°C(10min) 20°C/min	260°C(10min) 20°C/min	15°C/min 260°C(10min)	260°C(5min) 20°C/min	260°C(5min) 20°C/min	260°C(6min) 15°C/min

Cabe destacar que la reproducibilidad de los tiempos de retención ($n=6$) de los FAME obtenidos en cada uno de los sets de columnas estudiados fue muy buena, con una desviación estándar en 1D y 2D menor de 0.02 min y 0.0002 min, respectivamente. Finalmente, en cuanto a los valores óptimos de los parámetros más influyentes, recogidos en la **Tabla 35**, se observó que, a medida que aumentaba la longitud de la segunda columna, independientemente de su naturaleza, aumentaban todos ellos pero, de forma más notable, el flujo de la segunda dimensión.

6.5.1.1. INFLUENCIA DE LA ORTOGONALIDAD DE LA COMBINACIÓN DE COLUMNAS

Se compararon los resultados entre combinaciones de columnas de diferente ortogonalidad pero idénticas longitudes (30 y 5 m, respectivamente), es decir entre *Set 1*, *Set 3* y *Set 6* (**Tabla 34**).

Comparando los tres cromatogramas en 3D de la **Figura 26**, pertenecientes a los *Set 1*, *Set 3* y *Set 6*, se concluyó que, atendiendo al número de átomos de carbono de los FAME, eluyeron en orden creciente, siempre con respecto al tiempo de retención en la primera dimensión (1t_r), con independencia del conjunto de columnas empleadas. Sin embargo, el orden de elución de los compuestos dentro de una misma familia de FAME sí que fue dependiente del set de columnas utilizado. Mientras que en el *Set 1* (ortogonalidad convencional, **Figura 26a**) eluyeron en orden decreciente al número de insaturaciones, en los sets con ortogonalidad inversa ocurrió lo contrario, es decir, los 1t_r fueron menores para los FAME saturados.

En general, se observó que la simetría de pico en ambas dimensiones de todos los FAME era mejor en el *Set 1*, sobre todo porque cuanto mayor era el número de carbonos y la presencia de insaturaciones, más se alargaban los picos en la 2D , comportamiento muy evidente en el *Set 3* (**Figura 26b**). Además, estas formas de pico más simétricas, notables en el set ortogonal convencional, favorecían la estimación de líneas de tendencias de elución de FAME en los cromatogramas en 2D. Sin embargo, los tiempos de retención de los compuestos se reducían un promedio de 20 min utilizando los sets de ortogonalidad inversa (*Set 3*, *Set 6*; **Figura 26b**, **26c**, respectivamente), especialmente a medida que aumentaba el número de átomos de carbono de los FAME.

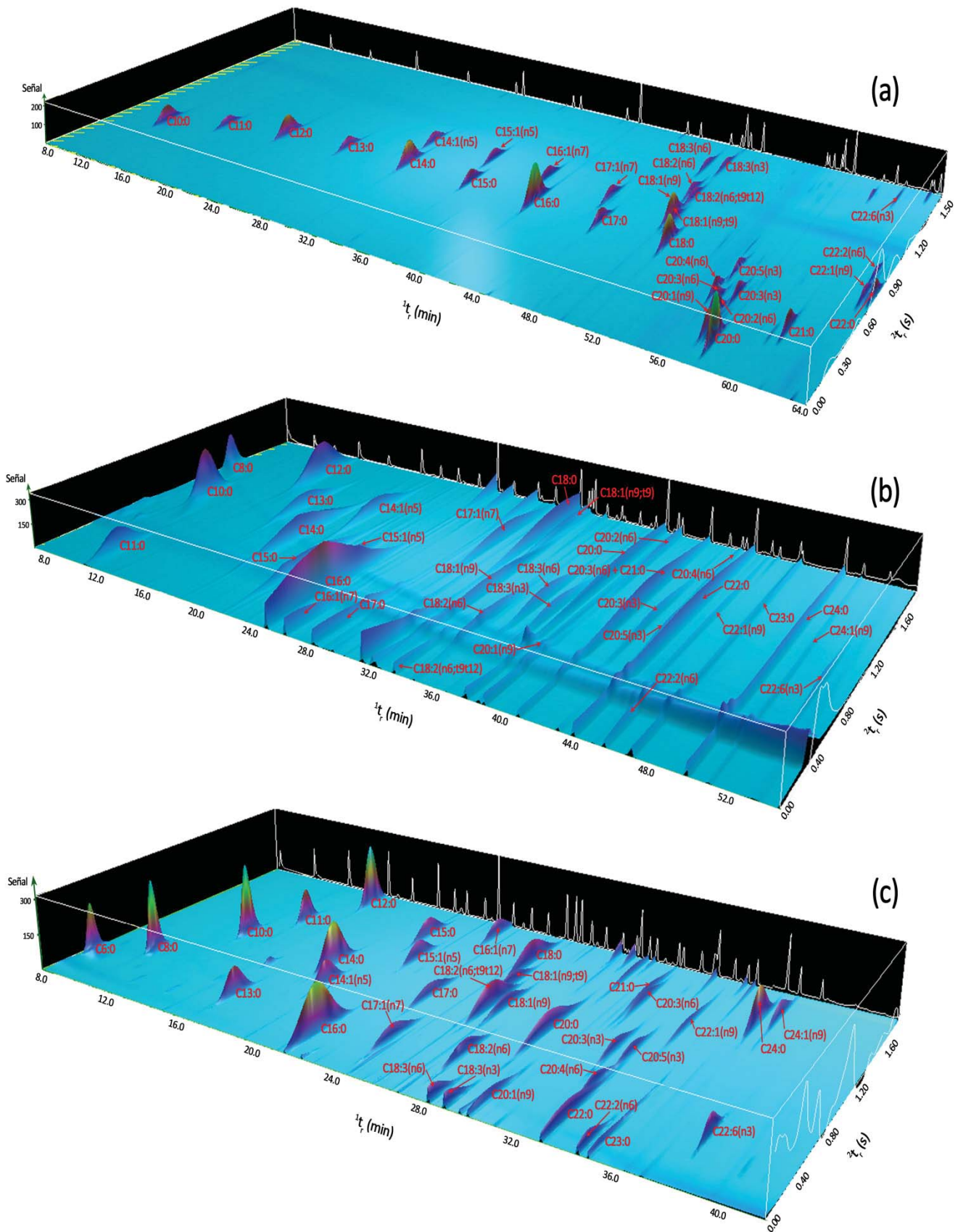


Figura 26. Cromatogramas en 3D de la mezcla de patrones S37 analizada empleando las condiciones finales de las 3 combinaciones de columnas: (a) Set 1, (b) Set 3 y (c) Set 6.

Con respecto a los FAME de la misma familia e igual número de instauraciones, por ejemplo C20:3(n3) y C20:3(n6), la tendencia fue independiente de la combinación de columnas. Eluyeron antes los que contenían el doble enlace más próximo al grupo éster, es decir, en orden decreciente con respecto a sus valores “n”. Siguiendo el ejemplo, se observa en los tres cromatogramas de la **Figura 26** que los t_r son menores para el C20:3(n6).

Por otra parte, la **Figura 27** muestra la separación bidimensional de las dos mezclas de isómeros de los ácidos linoléico y linolénico mediante tres combinaciones de columnas de diferente ortogonalidad: *Set 1*, *Set 3* y *Set 6*. Las **Figura 27a**, **27b**, **27c**, situadas en la columna de la izquierda corresponden a los cromatogramas en 3D del ácido linoléico en cada uno de los sets; mientras que las **Figura 27d**, **27e**, **27f**, es decir, las de la columna de la derecha, muestran el orden de elución de los isómeros del ácido linolénico en cada una de las combinaciones.

Se observó que, en la combinación ortogonal convencional (**Figura 27a**, **27d**) eluían primero los isómeros con todos los dobles enlaces cis y, después, los trans. En caso de aparecer isómeros con mezcla cis-trans, su comportamiento fue menos sistemático, eluyendo generalmente a mayores tiempos de retención que los trans. En cambio, en las combinaciones de ortogonalidad inversa la tendencia fue diferente, primero eluyeron los isómeros con todos los dobles enlaces trans, a continuación las mezclas cis-trans y, por último, los cis. Además, con estas combinaciones de columnas se lograron separar los 8 isómeros del ácido linolénico, especialmente los isómeros con mezcla cis-trans, como se muestra en las **Figura 27e**, **27f**, en comparación con la **Figura 27d**.

Por todo ello se concluyó que, para realizar análisis de FAME con las mejores separaciones en 2D, especialmente entre familias de isómeros, y reduciendo todo lo posible los tiempos de análisis, resultaban más efectivas las combinaciones de columnas ortogonales inversas. De esta forma, el estudio se centró en los sets de ortogonalidad inversa, en los que se modificaron tanto la naturaleza como la longitud de la segunda columna.

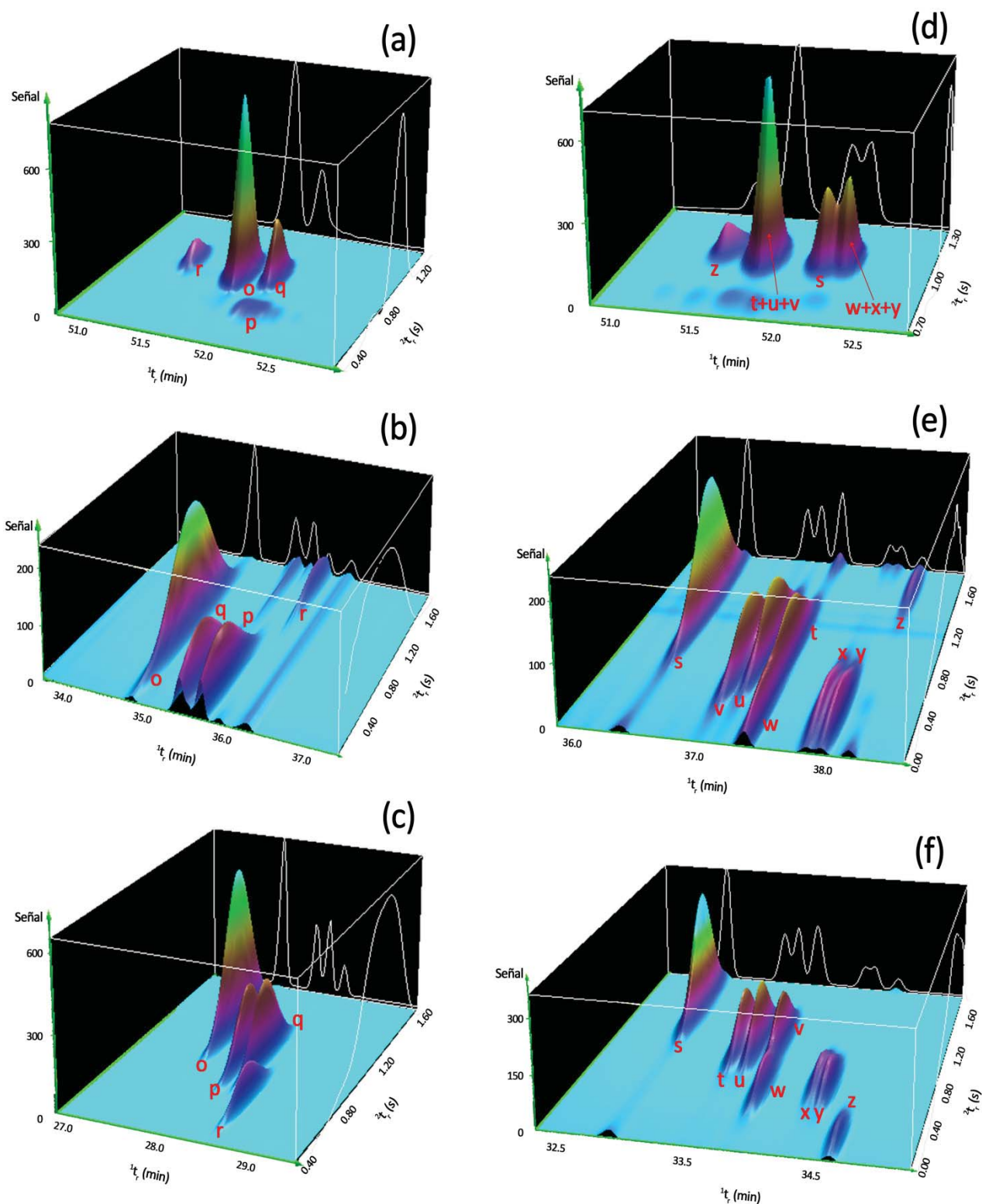


Figura 27. Ampliaciones de las zonas de elución en los cromatogramas en 3D de las mezclas de isómeros de ácidos linoléico y linolénico, analizados de forma individual empleando las condiciones finales de las 3 combinaciones de columnas: Set 1, (a) y (d); Set 3, (b) y (e); Set 6, (c) y (f), respectivamente. Abreviaturas de los 4 isómeros del ácido linoléico: (o) C18:2(n6;t9t12); (p) C18:2(n6;c9t12); (q) C18:2(n6;t9c12); (r) C18:2(n6). Abreviaturas de los 8 isómeros del ácido linolénico: (s) C18:3(n3;t9t12t15); (t) C18:3(n3;t9t12c15); (u) C18:3(n3;t9c12t15); (v) C18:3(n3;c9t12t15); (w) C18:3(n3;c9c12t15); (x) C18:3(n3;c9t12c15); (y) C18:3(n3;t9c12c15); (z) C18:3(n3).

6.5.1.2. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA Y LONGITUD DE LA SEGUNDA COLUMNA

Se compararon los resultados entre sets de ortogonalidad inversa compuestos por segundas columnas de diferente naturaleza (apolar o de polaridad media) y longitud (2, 5 y 10 m); combinaciones detalladas en la **Tabla 34**.

Sets con combinaciones de columnas polar alta × apolar: Set 2, Set 3, Set 4 (2, 5, 10 m)

Utilizando una segunda columna de naturaleza apolar se observó que, globalmente, una disminución en su longitud provocaba una reducción de los flujos de ambas dimensiones. Los t_r (min) se acortaban un promedio de 4 min, de forma más notable entre los 10 y 5 m.

Además, a medida que se redujo la longitud de la segunda columna, más próximos eluyeron los FAME. Sin embargo, mejoraban las formas de pico (menor ensanchamiento en la 2D) y la resolución en 2D. A pesar de que la separación en 2D de los isómeros del ácido linolénico en el Set 3, mostrado en la **Figura 27e**, fue muy similar para los otros dos sets de columnas, la longitud de la segunda columna influyó ligeramente en la resolución entre dos parejas de isómeros. Por una parte, la disminución de la longitud de la segunda columna mejoraba la resolución en la 1D entre los isómeros “x”, “y” (C18:3(n3;c9t12c15) y C18:3(n3;t9c12c15)) aunque empeoraba mínimamente la resolución en la 2D para la pareja de isómeros “t”, “w” (C18:3(n3;t9t12c15) y C18:3(n3;c9c12t15)).

Finalmente, la variación de la longitud de la segunda columna no mejoró la separación entre dos FAME (C21:0 y C20:3(n6)) que coeluían en estas tres combinaciones de columnas, como se observa en el cromatograma en 3D del Set 3 (**Figura 26b**), debido a la necesidad de determinar todos los FAME en el mismo análisis, dando prioridad a la separación de las mezclas de isómeros.

Por tanto, se concluyó que, empleando una segunda columna apolar de 2 m de longitud en combinaciones de ortogonalidad inversa (Set 2), se mejoraban las condiciones de separación y resolución en 2D de todos los FAME estudiados. Las **Figura 28** y **Figura 29** muestran el cromatograma en 3D de los FAME analizados y la ampliación de la zona de elución de la familia C18, respectivamente, empleando las condiciones finales del Set 2.

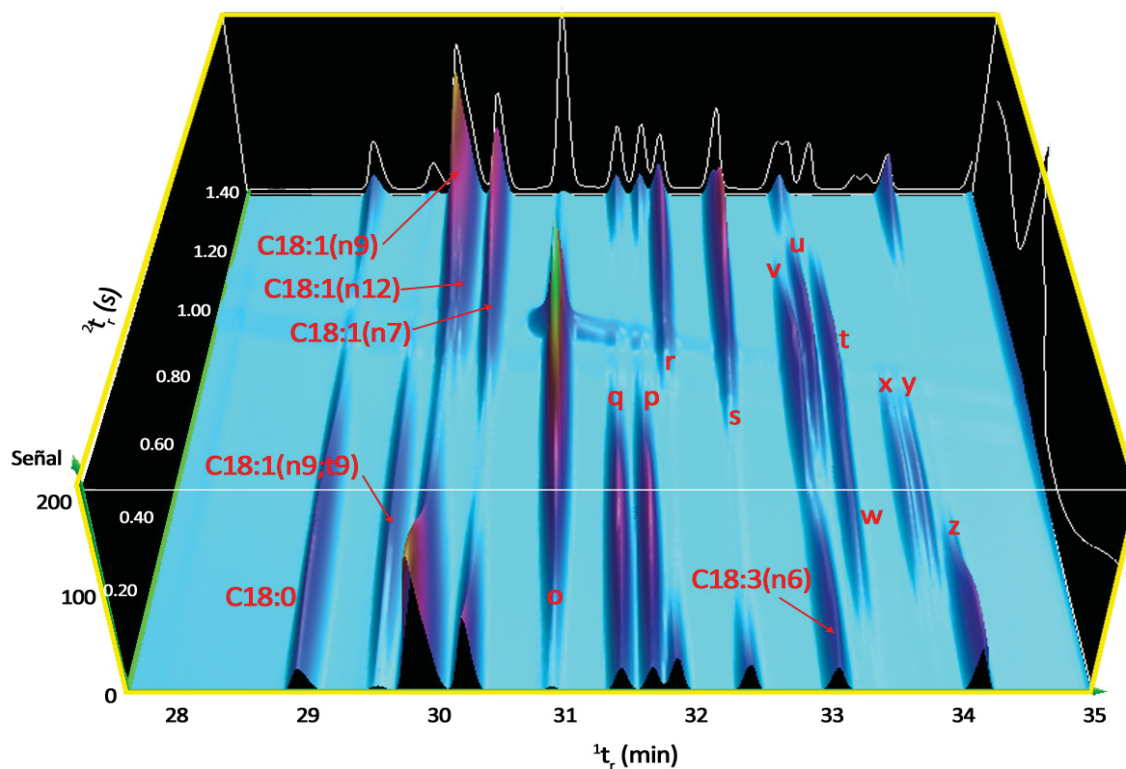


Figura 29. Ampliación de la zona de elución de la familia C18 en el cromatograma en 3D (Figura 28), empleando las condiciones finales del Set 2. Abreviaturas de los 4 isómeros del ácido linoléico: (o) C18:2(n6;t9t12); (p) C18:2(n6;c9t12); (q) C18:2(n6;t9c12); (r) C18:2(n6). Abreviaturas de los 8 isómeros del ácido linoléico: (s) C18:3(n3;t9t12t15); (t) C18:3(n3;t9t12c15); (u) C18:3(n3;t9c12t15); (v) C18:3(n3;c9t12t15); (w) C18:3(n3;c9c12t15); (x) C18:3(n3;c9t12c15); (y) C18:3(n3;t9c12c15); (z) C18:3(n3).

Sets con combinaciones de columnas polar alta × polar media: Set 5, Set 6, Set 7 (2, 5, 10 m)

Se observó que, empleando una segunda columna de polaridad media, el t_r de cada FAME incrementaba un promedio de 3 min cuando su longitud aumentaba de 5 a 10 m, mientras que no hubo diferencias importantes cuando la columna se redujo de 5 a 2 m.

Además de disminuir los tiempos de análisis, mejoraba la simetría de pico de los FAME, especialmente de la 2D , al reducir la longitud de la segunda columna. Sin embargo, al emplearse la segunda columna más corta (2 m) la resolución entre varios FAME empeoraba aún más que en el Set 6 (Figura 30), coeluyendo completamente algunos pares de picos: C18:1(n9) y C18:1(n12); “p”, “q” (C18:2(n6;c9t12) y C18:2(n6;t9c12)); y “x”, “y” (C18:3(n3;c9t12c15) y C18:3(n3;t9c12c15)).

Se concluyó que, empleando una segunda columna de polaridad media, una disminución en la longitud de la segunda columna no mejoraba de forma tan notable las condiciones de separación y resolución en 2D, como en el caso de los sets de ortogonalidad inversa, polar alta \times apolar. En este caso, las mejores condiciones de separación se obtuvieron con una segunda columna de polaridad media de 5 m de longitud (*Set 6*). Las **Figura 30** y **Figura 31** muestran el cromatograma en 3D de los FAME analizados y la ampliación de la zona de elución de la familia C18, respectivamente, empleando las condiciones finales del *Set 6*.

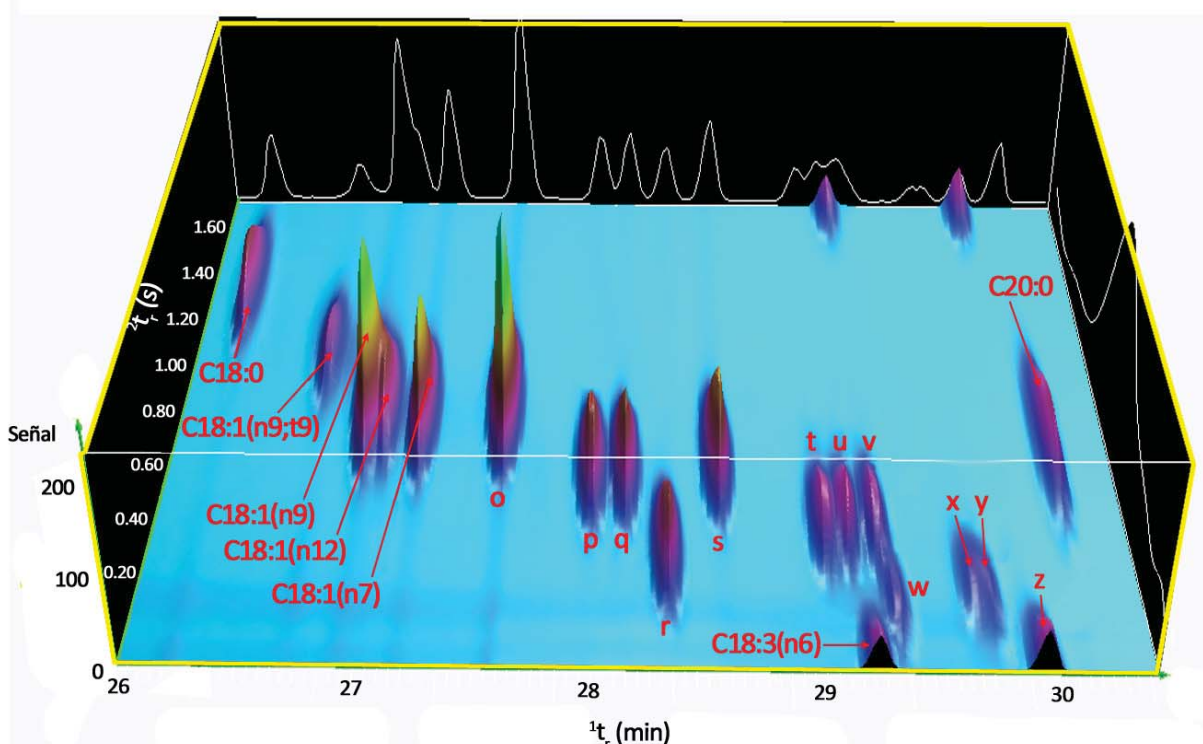


Figura 31. Ampliación de la zona de elución de la familia C18 en el cromatograma en 3D (**Figura 30**), empleando las condiciones finales del *Set 2*. Abreviaturas de los 4 isómeros del ácido linoléico: (o) C18:2(n6;t9t12); (p) C18:2(n6;c9t12); (q) C18:2(n6;t9c12); (r) C18:2(n6). Abreviaturas de los 8 isómeros del ácido linoléico: (s) C18:3(n3;t9t12t15); (t) C18:3(n3;t9t12c15); (u) C18:3(n3;t9c12t15); (v) C18:3(n3;c9t12t15); (w) C18:3(n3;c9c12t15); (x) C18:3(n3;c9t12c15); (y) C18:3(n3;t9c12c15); (z) C18:3(n3).

Finalmente, de la comparación entre las dos combinaciones de columnas que proporcionaban mejores separaciones en 2D de todos los FAME estudiados (**Figura 28** y **Figura 29**, para el *Set 2*; y **Figura 30** y **Figura 31** para el *Set 6*) se dedujo que con el *Set 6* se conseguía una separación en 2D en un menor tiempo de análisis (menor de 40 min) y con mejores simetrías de pico y resoluciones en 2D entre FAME, sobre todo para las mezclas de isómeros, visibles en la **Figura**

31. Además, con el Set 6 también se consiguió la separación de los dos FAME (C21:0 y C20:3(n6)) que coelúan en los sets con combinaciones polar alta × apolar.

6.5.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Las condiciones cromatográficas finales empleadas para la determinación de 47 FAME de los ácidos grasos naturales más característicos, empleando el Set 6: BPX-70 (polar alta) × ZB-35 (polar media) de 5 m, fueron las siguientes:

- ✓ Volumen inyección: 1 µL.
- ✓ Temperatura del inyector: 250 °C.
- ✓ Inyección en modo *Pulsed Splitless* (sin división de flujo, con pulso de presión).
- ✓ **Flujo de hidrógeno en la primera dimensión: 0.5 mL/min.**
- ✓ **Flujo de hidrógeno en la segunda dimensión: 20 mL/min.**
- ✓ Presión del pulso de inyección: 31 psi hasta 0.75 min.
- ✓ Flujo de purga hacia la válvula de venteo: 50 mL/min para 0.75 min.
- ✓ Flujo de purga del septum: 3 mL/min.
- ✓ Flujo de ahorro de gas: 15 mL/min después de 2 min.
- ✓ **Periodo de modulación: 1.70 s.**
- ✓ **Programa de temperatura del horno:**

	Pendiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Inicialmente</i>		60	0
<i>Rampa 1</i>	10	150	0
<i>Rampa 2</i>	3	230	0
<i>Rampa 3</i>	20	260	5

- ✓ Temperatura del FID: 260 °C.
- ✓ Flujo de hidrógeno en el FID: 20 mL/min.
- ✓ Flujo de aire en el FID: 450 mL/min.
- ✓ Flujo de nitrógeno (*make-up*) en el FID: 25 mL/min.
- ✓ Frecuencia de adquisición de datos: 200Hz/.001min.

La **Tabla 36** muestra los 47 FAME estudiados con los dos tiempos de retención para su determinación cromatográfica: 1t_r (min) y 2t_r (s).

Tabla 36. Lista de FAME identificados dispuestos por orden de elución en la primera dimensión, con sus tiempos de retención en la primera (¹t_r) y segunda (²t_r) dimensión.

Abreviaturas isómeros	FAME	¹ t _r (min)	² t _r (s)
	C6:0	8.1	0.30
	C8:0	10.6	0.47
	C10:0	13.0	0.87
	C11:0	14.3	1.18
	C12:0	15.7	1.55
	C13:0	17.2	0.30
	C14:0	18.8	0.81
	C14:1(n5)	19.8	0.62
	C15:0	20.6	1.35
	C15:1(n5)	21.7	1.09
	C16:0	22.4	0.20
	C16:1(n7)	23.3	1.56
	C17:0	24.4	0.77
	C17:1(n7)	25.3	0.35
	C18:0	26.3	1.35
	C18:1(n9;t9)	26.8	1.08
	C18:1(n9)	27.1	0.84
	C18:1(n12)	27.1	0.82
	C18:1(n7)	27.4	0.79
o	C18:2(n6;t9t12)	27.7	0.85
p	C18:2(n6;c9t12)	28.1	0.62
q	C18:2(n6;t9c12)	28.3	0.63
r	C18:2(n6)	28.4	0.38
	C18:3(n6)	29.3	0.02
s	C18:3(n3;t9t12t15)	28.7	0.67
t	C18:3(n3;t9t12c15)	29.1	0.46
u	C18:3(n3;t9c12t15)	29.3	0.47
v	C18:3(n3;c9t12t15)	29.4	0.49
w	C18:3(n3;c9c12t15)	29.4	0.23
x	C18:3(n3;c9t12c15)	29.8	0.28
y	C18:3(n3;t9c12c15)	29.8	0.25
z	C18:3(n3)	30.0	0.01
	C20:0	30.2	0.77
	C20:1(n9)	30.7	1.52
	C20:2(n6)	31.0	1.50
	C21:0	32.1	1.34
	C20:3(n6)	32.4	1.25
	C20:3(n3)	33.2	0.78
	C20:4(n6)	33.8	0.46
	C20:5(n3)	33.9	0.78
	C22:0	34.0	0.19
	C22:1(n9)	34.8	1.14
	C22:2(n6)	35.4	0.07
	C23:0	35.8	0.09
	C24:0	37.2	1.33
	C24:1(n9)	37.8	1.44
	C22:6(n3)	38.7	0.39

6.6. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Para determinar el perfil de los ácidos grasos naturales más característicos de 4 a 24 carbonos en muestras de vegetales, en este caso, hojas de brócoli, fueron necesarias dos etapas en el tratamiento de muestra. La primera de ellas consistió en un tratamiento de extracción de los ácidos grasos de la matriz mediante fluidos supercríticos. A continuación, se realizó una derivatización con KOH y catalizador BF₃ en metanol, para transformarlos en ésteres metílicos de ácidos grasos, permitiendo así su separación mediante cromatografía de gases bidimensional.

6.6.1 MÉTODO PROPUESTO

Se pesaron 0.3 g de hojas liofilizadas de brócoli en la celda de extracción de 2 mL, colocándose en el horno del equipo SFE. Después de 10 min de extracción estática, se cambió a modo dinámico, trabajando durante 60 min con un flujo de 3 mL/min de CO₂ modificado con un 15 % de metanol, a 65 °C y 250 bar de presión, recogiendo el extracto en un vial de vidrio de 20 mL con tapa perforada, al que se había añadido previamente 1 mL de metanol. Finalmente, el extracto de hojas de brócoli se diluyó con metanol hasta un volumen final de 20 mL.

A continuación, se llevó a cabo la etapa de derivatización. Se tomaron 2 mL del extracto en un tubo sellado, añadiendo 2 mL de KOH 1N en metanol para hidrolizar los ácidos grasos a 90 °C durante 20 min. Una vez que estaba la muestra a temperatura ambiente, se añadieron 3 mL de BF₃ al 14% en metanol, calentándose en el horno nuevamente a 90 °C durante 20 min. Posteriormente y una vez fría la muestra, se añadieron 2 mL de hexano y 8.5 mL de agua desionizada, útiles para favorecer el lavado y la aparición de dos fases. La mezcla se agitó durante 10 min e inmediatamente después se centrifugó durante 5 min (1000×g; 20 °C). A continuación, se extrajo la fase orgánica, que contenía los ésteres metílicos, filtrándose a través de un filtro de nylon (0.45 µm) y recogiendo en un vial de 2 mL. Finalmente, se eliminó el hexano con el sistema de arrastre mediante corriente de nitrógeno, reconstituyéndose el extracto de ésteres metílicos en 2 mL de diclorometano.

6.7. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES

Se analizaron hojas liofilizadas de brócoli, de tres variedades diferentes: *Naxos*, *Nubia* y *Viola*. El brócoli fue cultivado y las hojas liofilizadas, para su conservación hasta su análisis, en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC, Murcia, España),

suministradas por la Dra. Cristina García-Viguera. Todas las muestras fueron analizadas por sextuplicado.

6.7.1. DETERMINACIÓN DE FAME EN HOJAS DE BRÓCOLI

El método GC×GC-FID optimizado con la combinación de columnas BPX-70 × ZB-35 (5 m) fue aplicado para tratar de identificar los ácidos grasos presentes en muestras de hojas de brócoli de tres variedades diferentes.

A partir del cromatograma de la mezcla de los 47 FAME analizados mediante el método cromatográfico optimizado (**Figura 30**), se creó una plantilla para identificar los FAME de cualquier muestra analizada con el mismo método, de una forma rápida y sencilla.

La **Figura 32** muestra la plantilla de referencia creada a partir de los tiempos de retención (1t_r , 2t_r) de cada uno de los FAME analizados de forma individual con el método propuesto.

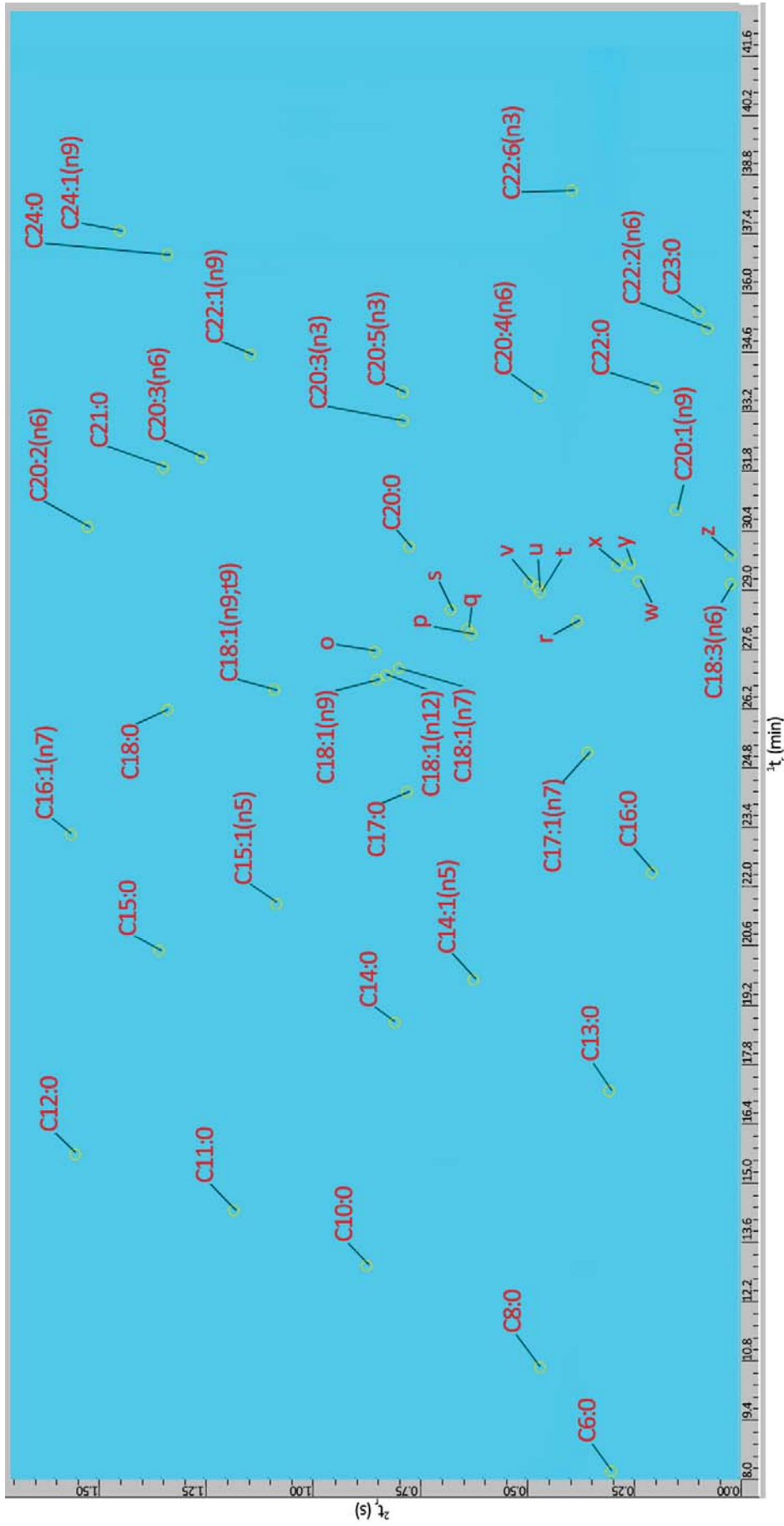


Figura 32. Plantilla de identificación en 2D de 47 FAME analizados mediante el método cromatográfico establecido para el Set 6. Abreviaturas de los 4 isómeros del ácido linoléico: (o) C18:2(n6;t9t12); (p) C18:2(n6;c9t12); (q) C18:2(n6;t9c12); (r) C18:2(n6); (s) C18:3(n3;t9t12t15); (t) C18:3(n3;t9t12c15); (u) C18:3(n3;t9c12t15); (v) C18:3(n3;c9t12t15); (w) C18:3(n3;c9c12t15); (x) C18:3(n3;t9c12c15); (y) C18:3(n3;t9c12c15); (z) C18:3(n3).

Para llevar a cabo la identificación de los analitos en muestras reales se analizaron las muestras mediante GC×GC-FID y, a través del software *GC Image*, se establecieron correspondencias entre los picos en la plantilla y los picos detectados en cada cromatograma en 2D. De esta forma, se confirmó la identificación o ausencia de cada uno de los FAME en cada muestra.

La identificación de FAME en muestras reales fue bastante eficiente. Se consiguió determinar la presencia de 34 FAME en las muestras de hojas de brócoli de la variedad *Naxos*, 32 en la variedad *Nubia* (se muestra, a modo de ejemplo, su cromatograma en 2D en la **Figura 33**) y 35 en la variedad *Viola*. En la **Tabla 37** aparecen especificados los FAME presentes en cada una de las variedades, con sus 1t_r y 2t_r .

Desde un punto de vista cualitativo, se observó que las señales más intensas en todas las muestras analizadas correspondían a los mismos 4 ácidos grasos, dos de ellos saturados: ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0); y dos insaturados, de mayor intensidad, especialmente el último: ácidos linoléico (C18:2(n6)) y linolénico (C18:3(n3)). La presencia de este último analito fue particularmente relevante al pertenecer al grupo de ácidos grasos ω -3, ya que estos compuestos no sólo promueven la salud cardiovascular sino también, el buen funcionamiento de muchos otros sistemas biológicos.

Tabla 37. FAME identificados en cada una de las tres variedades de hojas de brócoli (n=6): *Naxos*, *Nubia* y *Viola*.

FAME	NAXOS		NUBIA		VIOLA	
	¹ t _r (min)	² t _r (s)	¹ t _r (min)	² t _r (s)	¹ t _r (min)	² t _r (s)
C6:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C8:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C10:0	12.8	0.89	12.8	0.89	12.8	0.88
C11:0	14.2	1.18	14.2	1.18	14.2	1.19
C12:0	15.6	1.57	15.6	1.56	15.6	1.55
C13:0	17.2	0.30	17.2	0.30	17.2	0.28
C14:0	18.9	0.80	18.8	0.80	18.8	0.81
C14:1(n5)	19.8	0.60	19.8	0.62	19.8	0.61
C15:0	20.6	1.35	20.6	1.35	20.6	1.34
C15:1(n5)	21.7	1.09	21.7	1.10	21.7	1.10
C16:0	22.5	0.20	22.4	0.20	22.5	0.18
C16:1(n7)	23.3	1.55	23.3	1.56	23.3	1.54
C17:0	24.4	0.77	24.3	0.77	24.4	0.75
C17:1(n7)	25.3	0.35	25.3	0.35	25.3	0.36
C18:0	26.3	1.33	26.3	1.33	26.4	1.29
C18:1(n9;t9)	26.8	1.08	26.8	1.08	26.9	1.04
C18:1(n9)	27.1	0.84	27.0	0.85	27.1	0.86
C18:1(n12)	27.2	0.82	27.1	0.82	27.1	0.82
C18:1(n7)	27.4	0.80	nd	nd	27.4	0.81
C18:2(n6;t9t12)	27.7	0.84	27.7	0.85	27.7	0.83
C18:2(n6;c9t12)	28.1	0.62	28.1	0.64	28.1	0.61
C18:2(n6;t9c12)	28.3	0.63	28.3	0.63	28.3	0.63
C18:2(n6)	28.5	0.37	28.5	0.38	28.5	0.36
C18:3(n6)	29.3	0.02	29.3	0.03	29.3	0.02
C18:3(n3;t9t12t15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:3(n3;t9t12c15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:3(n3;t9c12t15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:3(n3;c9t12t15)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C18:3(n3;c9c12t15)	29.4	0.23	29.4	0.23	29.5	0.21
C18:3(n3;c9t12c15)	29.8	0.29	29.8	0.27	29.7	0.28
C18:3(n3;t9c12c15)	29.8	0.23	29.9	0.24	29.9	0.23
C18:3(n3)	30.1	0.01	30.1	0.01	30.1	0.01
C20:0	30.2	0.76	30.2	0.76	30.3	0.77
C20:1(n9)	30.7	1.51	nd	nd	30.7	1.47
C20:2(n6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C21:0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C20:3(n6)	32.4	1.26	32.4	1.24	32.4	1.21
C20:3(n3)	33.2	0.79	33.2	0.78	33.2	0.78
C20:4(n6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C20:5(n3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C22:0	34.0	0.20	34.0	0.19	34.0	0.20
C22:1(n9)	34.8	1.15	34.8	1.14	34.8	1.12
C22:2(n6)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C23:0	nd	nd	nd	nd	35.7	0.08
C24:0	37.2	1.32	37.2	1.33	37.2	1.33
C24:1(n9)	37.8	1.43	37.8	1.43	37.8	1.44
C22:6(n3)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: FAME no detectado.

6.8. CONSECUENCIAS

Se ha puesto a punto un método para la separación de un gran número de FAME, incluidos dos grupos de isómeros de la familia C18: de los ácidos linoléico y linolénico, mediante GC×GC-FID con un modulador de flujo capilar.

La combinación de columnas que ha proporcionado mejores resultados, en cuanto a resoluciones y simetrías en 2D y menores tiempos de análisis, está compuesta por una primera columna de polaridad alta (BPX-70) seguida de una columna de polaridad media de 5 m de longitud (ZB-35).

La elución de FAME, con respecto al tiempo de retención en la primera dimensión, con esta combinación de columnas de ortogonalidad inversa, se ha producido en orden creciente al número de átomos de carbono, de C6 a C24. Atendiendo a los compuestos pertenecientes a una misma familia, eluyen en orden decreciente al número de insaturaciones. Igualmente, para FAME de la misma familia e igual número de insaturaciones, eluyen en orden decreciente con respecto a sus valores "n". Finalmente, con respecto a la geometría de los isómeros, eluyen primero los isómeros con todos los dobles enlaces trans, a continuación las mezclas cis-trans y, por último, los cis.

Se ha creado una plantilla de referencia para identificar los 47 FAME estudiados en cualquier muestra analizada con el mismo método, de una forma rápida y sencilla.

El método propuesto se ha aplicado a diversas muestras de hojas de brócoli pertenecientes a tres variedades diferentes *Naxos*, *Nubia* y *Viola*.

Se ha identificado la presencia de más de 30 FAME en cada una de las variedades de brócoli estudiadas: 34 en *Naxos*, 32 en *Nubia* y 35 en *Viola*.

Cualitativamente, el pico más intenso en todas las muestras ha correspondido al ácido linolénico, C18:3(n3), cuya determinación ha resultado importante debido a sus conocidas propiedades favorables en nuestra alimentación por tratarse de un ácido graso ω -3.

6.9. BIBLIOGRAFÍA

- ⁶⁴ J.K. Virtanen, D.S. Siscovick, R.N. Lemaitre, W.T. Longstreth, D. Spiegelman, E.B. Rimm, I.B. King, D. Mozaffarian. *Circulating omega-3 polyunsaturated fatty acids and subclinical brain abnormalities on MRI in older adults: the cardiovascular health study*. Journal of the American Heart Association, 2 (2013) 1-11.
- ⁶⁵ P. Benatti, G. Peluso, R. Nicolai, M. Calvani. *Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties*. Journal of the American College of Nutrition, 23 (2004) 281-302.
- ⁶⁶ H.H. Wijngaard, C. Rößle, N. Brunton. *A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants*. Food Chemistry, 116 (2009) 202-207.
- ⁶⁷ C. López-Berenguer, M.C. Martínez-Ballesta, D.A. Moreno, M. Carvajal, C. García-Viguera. *Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 57 (2009) 572-578.
- ⁶⁸ R. Domínguez-Perles, D.A. Moreno, M. Carvajal, C. Garcia-Viguera. *Composition and antioxidant capacity of a novel beverage produced with green tea and minimally-processed byproducts of broccoli*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12 (2011) 361-368.
- ⁶⁹ J. López-Cervantes, L.G. Tirado-Noriega, D.I. Sánchez-Machado, O.N. Campas-Baypoli, E.U. Cantú-Soto, J.A. Núñez-Gastélum. *Biochemical composition of broccoli seeds and sprouts at different stages of seedling development*. International Journal of Food Science and Technology, 48 (2013) 2267-2275.
- ⁷⁰ A. Ruiz-Rodríguez, G. Reglero, E. Ibáñez. *Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 51 (2010) 305-326.
- ⁷¹ F. Sahena, I.S.M. Zaidul, S. Jinap, A.A. Karim, K.A. Abbas, N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar. *Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review*. Journal of Food Engineering, 95 (2009) 240-253.
- ⁷² T. Yamada, T. Uchikata, S. Sakamoto, Y. Yokoi, S. Nishiumi, M. Yoshida, E. Fukusaki, T. Bamba. *Supercritical fluid chromatography/Orbitrap mass spectrometry based lipidomics platform coupled with automated lipid identification software for accurate lipid profiling*. Journal of Chromatography A, 1301 (2013) 237-242.
- ⁷³ Y. Ando, T. Sasaki. *GC separation of cis-eicosenoic acid positional isomers on an ionic liquid SLB-IL100 stationary phase*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 88 (2011) 743-748.
- ⁷⁴ P. Delmonte, A.R. Fardin Kia, J.K.G. Kramer, M.M. Mossoba, L. Sidisky, J.I. Rader. *Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column*. Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 545-554.

- ⁷⁵ L. Hejazi, D.B. Hibbert, D. Ebrahimi. *Identification of the geometrical isomers of α -linolenic acid using gas chromatography/mass spectrometry with a binary decision tree*. *Talanta*, 83 (2011) 1233-1238.
- ⁷⁶ P. Q. Tranchida, P. Donato, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. *Comprehensive chromatographic methods for the analysis of lipids*. *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 191-205.
- ⁷⁷ P.Q. Tranchida, R. Costa, P. Donato, D. Sciarrone, C. Ragonese, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. *Acquisition of deeper knowledge on the human plasma fatty acid profile exploiting comprehensive 2-D GC*. *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 3347-3351.
- ⁷⁸ C. Villegas, Y. Zhao, J.M. Curtis. *Two methods for the separation of monounsaturated octadecenoic acid isomers*. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 775-784.
- ⁷⁹ S.P. Pyl, C.M. Schietekat, K.M. Van Geem, M.F. Reyniers, J.Vercammen, J. Beens, G.B. Marin. *Rapeseed oil methyl ester pyrolysis: On-line product analysis using comprehensive two-dimensional gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 3217-3223.
- ⁸⁰ Q. Gu, F. David, F. Lynen, K. Rumpel, G. Xu, P. De Vos, P. Sandra. *Analysis of bacterial fatty acids by flow modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography with parallel flame ionization detector/mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4448-4453.
- ⁸¹ Q. Gu, F. David, F. Lynen, P. Vanormelingen, W. Vyverman, K. Rumpel, G. Xu, P. Sandra. *Evaluation of ionic liquid stationary phases for one dimensional gas chromatography–mass spectrometry and comprehensive two dimensional gas chromatographic analyses of fatty acids in marine biota*. *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 3056-3063.
- ⁸² P.J. Marriott, P. Schoenmakers, Z. Wu. *Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography - An update*. *LC-GC Europe*, 25 (2012) 266, 268, 270, 272-275.
- ⁸³ J. Harynuk, B. Vlaeminck, P. Zaher, P.J. Marriott. *Projection of multidimensional GC data into alternative dimensions—exploiting sample dimensionality and structured retention patterns*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 602-613.
- ⁸⁴ P.Q. Tranchida, A. Giannino, M. Mondello, D. Sciarrone, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. *Elucidation of fatty acid profiles in vegetable oils exploiting group-type patterning and enhanced sensitivity of comprehensive two-dimensional gas chromatography*. *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 1797-1802.
- ⁸⁵ S.E. Reichenbach, X. Tian, Q. Tao, E.B. Ledford Jr., Z. Wu, O. Fiehn. *Informatics for cross-sample analysis with comprehensive two-dimensional gas chromatography and high-resolution mass spectrometry (GCxGC–HRMS)*. *Talanta*, 83 (2011) 1279-1288.

- ⁸⁶ J.V. Seeley, N.J. Micyus, J.D. McCurry, S.K. Seeley. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with a simple fluidic modulator*. *American Laboratory News*, 38 (2006) 24-26.
- ⁸⁷ L. Mondello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review*. *Mass Spectrometry Reviews*, 27 (2008) 101-124.

**CAMBIOS PRODUCIDOS POR EL TOSTADO
EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE FRUTOS SECOS**

7.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la ingesta de frutos secos se ha incrementado debido a los efectos beneficiosos que generan al incluirlos en la alimentación^{88,89}. Este aumento se ha visto influenciado por los nuevos patrones de consumo, derivados de hábitos alimentarios más saludables relacionados con la dieta mediterránea, que determinan nuevos usos y no sólo como aperitivos o snacks, por ejemplo como ingredientes que aportan valor añadido a otros alimentos como el chocolate, los cereales de desayuno o las galletas^{90,91}. Entre todos los frutos secos comestibles, los cacahuets, las almendras, las avellanas y las pipas de girasol son algunos de los más populares en los países mediterráneos^{89,92}.

Como ya se ha citado en el capítulo IV, el aroma de los alimentos está formado por infinidad de sustancias químicas cuyo estudio se ha empleado para evaluar su calidad, es decir, la aceptación o el rechazo por el consumidor. Por su parte, los frutos secos crudos no destacan por tener un aroma especialmente intenso. Sin embargo, al tostarse, presentan un olor característico e identificable. Es durante este proceso de tostado cuando ciertas estructuras se sintetizan o modifican, mediante una compleja serie de reacciones a partir de precursores específicos, cuya combinación aporta al producto final su textura, color, aroma y sabor característico⁹³⁻⁹⁵, haciéndolos más gustosos al paladar, uno de los principales objetivos del proceso de tostado.

Se generan numerosos compuestos volátiles, principalmente a través de: (i) la reacción de Maillard, donde se producen derivados nitrogenados, esencialmente pirazinas, y otros compuestos como furanos y aldehídos; (ii) la caramelización de azúcares, responsable de la aparición, entre otros, de derivados del furano; y (iii) la degradación de los lípidos que, aunque suele estar asociada con la formación de aromas desagradables, también favorece la aparición de ciertos aldehídos y cetonas que proporcionan notas dulces y afrutadas⁹⁵⁻⁹⁹. Otros grupos químicos importantes que aparecen son alcoholes, hidrocarburos y ciertos derivados fenólicos^{95,98,100,101}.

La mejor manera de conocer la percepción global experimentada al oler un producto es mediante un análisis sensorial^{94,97}, a través de las denominadas catas que, sin embargo, conllevan una serie de inconvenientes, entre los que destacan la necesidad de emplear un panel de catadores entrenado, formado por un número considerable de individuos, así como un elevado coste (de dinero y de tiempo), entre otros factores. De ahí la existencia y el empleo

predominantemente del análisis instrumental de forma exclusiva o combinado con el análisis sensorial^{93,100-104}.

Sin embargo, el análisis instrumental debe llevarse a cabo sólo si previamente se han tratado las muestras y se han aislado los compuestos volátiles del resto de interferentes de la matriz, volátiles que se encuentran en un intervalo de volatilidad y concentración muy amplio que, en muchos casos, va acompañado por problemas de inestabilidad. Por ello, el tratamiento de muestra resulta ser normalmente la etapa más crítica de todo el proceso analítico.

Existen multitud de tratamientos de muestra para extraer los compuestos volátiles de matrices alimentarias, como ya se ha señalado en el capítulo IV. Concretamente, en frutos secos, se han empleado técnicas de destilación-extracción simultánea (SDE)^{100,105}, hidro-destilación¹⁰³, diferentes modos de extracción con disolventes^{104,106-108} e incluso SFE¹⁰⁹. Otros procedimientos ampliamente utilizados han sido las extracciones SPE y SPME^{95,98,106,110} que, junto con las técnicas de headspace, tanto estático^{111,112} como dinámico^{93,113}, han jugado un papel muy importante en el aislamiento de este tipo de analitos, incluso llegándose a combinar (HS-SPME)^{95,110,114} para concentrar las muestras cuando los analitos estaban presentes en muy bajas concentraciones.

En términos generales, las técnicas de HS se caracterizan por una manipulación mínima de la muestra y por no emplear disolventes orgánicos, lo que hace que sean sumamente sencillas, a pesar de que no permiten concentrar los volátiles o discriminar aquellos menos volátiles, lo que provoca una baja sensibilidad del método. Sin embargo, permiten obtener extractos mucho más limpios, sin impurezas o contaminantes, y posteriormente evitan la interferencia cromatográfica del pico del disolvente, que muchas veces impide la determinación de algunos volátiles. Asimismo, el HS no daña ni destruye las muestras, de modo que se obtiene el extracto de la forma más parecida posible a la fracción volátil que se inhala y llega al epitelio olfativo al oler cualquier alimento (niveles organolépticos), al tiempo que permite el acoplamiento directo con GC¹¹⁵.

Precisamente, la técnica instrumental más adecuada para identificar y cuantificar estos compuestos volátiles es la GC. Al igual que para el análisis de estos analitos en vinos (capítulo IV), en matrices de frutos secos la técnica más ampliamente utilizada es la GC-MS^{95,102,103,105,113,114} y, en menor medida, con detectores FID^{96,97,103,114}. Cabe mencionar que la nariz electrónica también se ha utilizado para estudiar específicamente ciertas fracciones

volátiles, con el objetivo de obtener la máxima cercanía entre los sabores derivados de los alimentos y las respuestas medidas objetivamente con equipos^{100,101,103,105}.

Sin embargo, como ya se ha citado anteriormente en el capítulo VI, la tendencia actual está más orientada hacia la separación y determinación mediante técnicas multidimensionales de cromatografía de gases⁵³, con el objetivo de ampliar el conocimiento de la composición de la fracción volátil de matrices complejas. Destacan la cromatografía bidimensional de *heart-cutting* con detector de espectrometría de masas cuadrupolar (2D-GC-qMS)^{93,102,107} pero, sobre todo, GC×GC acoplada a detectores FID⁹⁹ y qMS^{98,104,106} ó TOF^{108,110}.

En cuanto a los moduladores utilizados en GC×GC para el análisis de estos analitos, normalmente son moduladores térmicos^{98,104,106,108,110}. Sin embargo, uno de los objetivos de este estudio es demostrar la idoneidad de la técnica GC×GC equipada con un modulador de flujo capilar⁹⁹, CFT, para analizar compuestos volátiles en diferentes frutos secos, debido a su rápida respuesta, su robustez y bajo precio.

Otro aspecto importante a tener en cuenta en la técnica GC×GC es, además de la combinación de columnas elegida para realizar los análisis, la optimización de los parámetros cromatográficos más influyentes en las separaciones en 2D. En este estudio, se ha pensado en el diseño de experimentos como alternativa para la optimización del método cromatográfico. Concretamente, el diseño central compuesto (CCD) permite un rastreo rápido de intervalos de condiciones amplios, además de indicar la participación de cada factor en la respuesta final. Además, los CCD se utilizan para describir los efectos individuales y el efecto acumulativo de los parámetros en la respuesta, siendo el diseño factorial con más éxito para la optimización de parámetros con un número limitado de experimentos¹¹⁶.

Por tanto, el primer objetivo de este estudio ha consistido en acoplar el muestreador estático HS con el GC×GC-FID equipado con un modulador CFT, con el fin de separar e identificar los compuestos más característicos de la fracción volátil de cuatro frutos secos crudos y tostados. Para ello, se han optimizado, a través de CCD, los métodos cromatográficos de diferentes combinaciones de columnas con distintas ortogonalidades, es decir, se ha modificado la naturaleza tanto de la primera como de la segunda dimensión. Por último, el método HS-GC×GC-FID propuesto se ha empleado en la creación de una plantilla de referencia que sirviera para identificar los analitos estudiados en cada una de las muestras analizadas.

El segundo objetivo se ha basado en la identificación de las posibles diferencias en la fracción volátil de las muestras crudas y tostadas, a través de estudios comparativos de los perfiles en 2D, mediante la creación y el uso de plantillas de referencia de matriz, de forma rápida y sencilla.

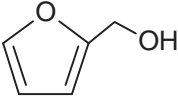
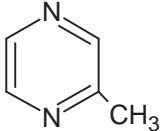
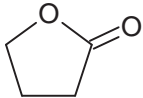
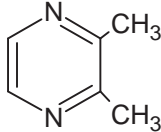
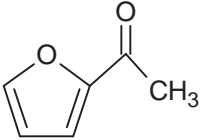
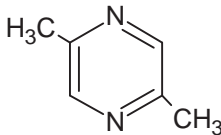
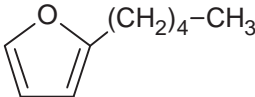
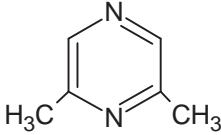
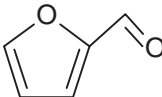
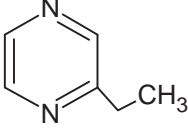

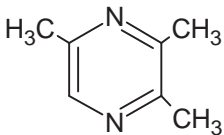

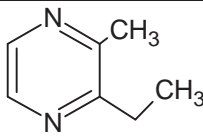
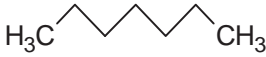
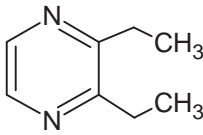
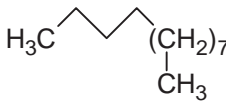
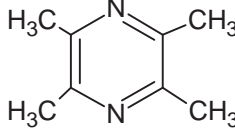
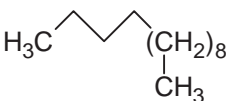
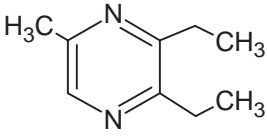
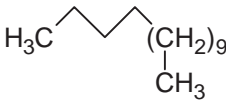
7.2. COMPUESTOS ESTUDIADOS

Se han estudiado 43 de los compuestos volátiles más representativos de la fracción volátil de los frutos secos crudos y tostados. La **Tabla 38** recoge toda la lista de compuestos volátiles, con nombres científicos, fórmulas y las abreviaturas con las que se han nombrado, según el grupo funcional al que pertenecían: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).

Tabla 38. Lista de los 43 compuestos volátiles estudiados con las abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).

	Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula		Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula
A1	2-metil-1-butanol (<i>sec-butil carbinol</i>) C ₅ H ₁₂ O		B6	alcohol bencílico C ₇ H ₈ O	
A2	3-metil-1-butanol (<i>isoamil alcohol</i>) C ₅ H ₁₂ O		B7	2-feniletanol (<i>alcohol feniletílico</i>) C ₈ H ₁₀ O	
A3	1-pentanol (<i>n-amil alcohol</i>) C ₅ H ₁₂ O		B8	2-metoxi-4-etilfenol (<i>4-etilguayacol</i>) C ₉ H ₁₂ O ₂	
A4	1-hexanol C ₆ H ₁₄ O		B9	2-metoxi-4-vinilfenol (<i>4-vinilguayacol</i>) C ₉ H ₁₀ O ₂	
A5	2-etil-1-hexanol C ₈ H ₁₈ O		C1	1-pentanal (<i>valeraldehído</i>) C ₅ H ₁₀ O	
A6	3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol (<i>linalol</i>) C ₁₀ H ₁₈ O		C2	1-hexanal (<i>n-capronaldehído</i>) C ₆ H ₁₂ O	
B1	Benzaldehído C ₇ H ₆ O		C3	1-heptanal (<i>enataldehído</i>) C ₇ H ₁₄ O	
B2	bencenacetaldéhído (<i>fenilacetaldéhído</i>) C ₈ H ₈ O		C4	2-heptanona (<i>metilpentilcetona</i>) C ₇ H ₁₄ O	
B3	1-fenil-1-etanona (<i>acetofenona</i>) C ₈ H ₈ O		C5	3-heptanona (<i>butiltilcetona</i>) C ₇ H ₁₄ O	
B4	4-metilfenol (<i>p-cresol</i>) C ₇ H ₈ O		C6	1-nonanal (<i>pelargonaldehído</i>) C ₉ H ₁₈ O	
B5	2-metoxifenol (<i>guayacol</i>) C ₇ H ₈ O ₂		C7	trans-2-nonenal C ₉ H ₁₆ O	

(Continuación) Tabla 38. Lista de los 43 compuestos volátiles estudiados con las abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).

	Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula		Nombre Científico (Nombre Común)	Fórmula
F1	alcohol furfurílico (2-hidroximetil furano)		P1	2-metilpirazina	
	C ₅ H ₆ O ₂			C ₅ H ₆ N ₂	
F2	dihidro-2(3H)-furanona (γ-butirolactona)		P2	2,3-dimetilpirazina	
	C ₄ H ₆ O ₂			C ₆ H ₈ N ₂	
F3	1-(2-furanil) etanona (2-furilmetil cetona)		P3	2,5-dimetilpirazina	
	C ₆ H ₆ O ₂			C ₆ H ₈ N ₂	
F4	2-pentilfurano		P4	2,6-dimetilpirazina	
	C ₉ H ₁₄ O			C ₆ H ₈ N ₂	
F5	2-furaldehído		P5	2-etilpirazina	
	C ₅ H ₄ O ₂			C ₆ H ₈ N ₂	
H1	pentano		P6	2,3,5-trimetilpirazina	
	C ₅ H ₁₂			C ₇ H ₁₀ N ₂	
H2	hexano		P7	2-etil-3-metilpirazina	
	C ₆ H ₁₄			C ₇ H ₁₀ N ₂	
H3	heptano		P8	2,3-dietilpirazina	
	C ₇ H ₁₆			C ₈ H ₁₂ N ₂	
H4	dodecano		P9	2,3,5,6-tetrametilpirazina	
	C ₁₂ H ₂₆			C ₈ H ₁₂ N ₂	
H5	tridecano		P10	2,3-dietil-5-metilpirazina	
	C ₁₃ H ₂₈			C ₉ H ₁₄ N ₂	
H6	tetradecano				
	C ₁₄ H ₃₀				

7.3. MATERIAL, REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

7.3.1. EQUIPOS Y MATERIAL ADICIONAL

- Equipo GCxGC-FID 7890A (**Figura 2**, capítulo III) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EEUU).
- Muestreador Headspace estático HP 7694 modelo G1290 (**Figura 4**, capítulo III), de Agilent Technologies.
- Balanza analítica de precisión KERN ABT 220-5DM (Balingen, Alemania).
- Molino universal M20, IKA (IKA-Werke; Staufen, Alemania).
- Estufa con un intervalo de temperaturas de trabajo entre 50 y 300 °C, Heraeus (Madrid, España).
- Micropipetas Eppendorf, AG (Hamburg, Alemania).
- Viales de 20 mL, septums de silicona y adaptadores metálicos para headspace, de Agilent Technologies (referencias: 5182-0837 y 5183-4477, respectivamente).
- Material de uso general de laboratorio.

7.3.2. REACTIVOS Y PATRONES

- Hidrógeno, nitrógeno y aire, calidad Premier X50S de Carburos Metálicos (Barcelona, España).
- Etanol absoluto PA de Panreac (Barcelona, España).
- Patrones puros (> 97% pureza) e individuales de los 43 compuestos volátiles que aparecen detallados en la **Tabla 38**. Todos ellos de calidad analítica, de Sigma-Aldrich, Fluka y Supelco (Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, MO, EEUU).

7.3.3. COLUMNAS

Se emplearon un total de 6 columnas capilares para establecer las diferentes combinaciones de columnas:

- Columna apolar *DB-5MS* (5% fenilarilen-95% metilpolisiloxano, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de J&W Scientific, Agilent Technologies.
- Columna apolar *ZB-5MS* (5% fenilarilen-95% dimetilpolisiloxano, 5 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de Zebron, Phenomenex (Torrance, CA, EEUU).
- Columna de polaridad intermedia *ZB-35* (35% fenil-65% dimetilpolisiloxano, 5 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de Zebron, Phenomenex.

- Columna de polaridad alta *HP-INNOWax* (100% polietilenglicol, 5 m × 0.25 mm × 0.15 μm) de J&W Scientific, Agilent Technologies.
- Columna de polaridad alta *INNOWax* (100% polietilenglicol, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de J&W Scientific, Agilent Technologies.
- Columna de alta polaridad *BPX 70* (70% cianopropil-30% polisilfenilensiloxano, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), de SGE Analytical Science (Ringwood, Victoria, Australia).

7.4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES PATRÓN

Se prepararon disoluciones individuales de cada patrón puro de 100 μg/mL, utilizando etanol absoluto como disolvente. A partir de todas ellas se preparó una disolución mezcla de trabajo conteniendo 1 μg/mL de cada uno de los analitos.

Las disoluciones más concentradas se almacenaron en recipientes topacio sellados a -18 °C, mientras que la disolución de trabajo se conservó en el frigorífico a +4 °C; permaneciendo estables al menos durante 1 mes.

7.5. PROGRAMAS ESTADÍSTICOS

Los cálculos estadísticos se llevaron a cabo con el software *Statgraphics Centurión XVI* versión 16.1.03 (Statpoint Technologies; Warrenton, VA, EEUU). Se aplicaron diseños de experimentos, superficies de respuestas y optimizaciones mediante respuestas múltiples a diversos parámetros de los métodos cromatográficos.

7.6. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El tratamiento de muestra se llevó a cabo con un muestreador HS estático. Este equipo automatizado permitió, en primer lugar, la extracción directa de los compuestos volátiles de la fase gaseosa que estaban en equilibrio con la matriz sólida; y, posteriormente, la inyección automática en el equipo cromatográfico.

A pesar de ser un tratamiento de muestra sencillo desde el punto de vista experimental, el HS tiene bastantes parámetros a optimizar:

- ↪ cantidad de muestra.
- ↪ 3 temperaturas: temperatura del horno donde se establece el equilibrio entre la fase gaseosa y la fase sólida de la muestra; temperatura del loop o bucle de carga de un volumen constante de fase gaseosa; y temperatura del conducto de transferencia entre el loop y el inyector del sistema cromatográfico.
- ↪ nivel de agitación de las muestras en el horno durante el equilibrado de fases.
- ↪ 2 presiones de trabajo: presión del gas portador y presión de presurización del vial sellado.
- ↪ 5 tiempos de trabajo: tiempo de equilibrado de fases en el horno; tiempo de presurización del vial; tiempo de llenado del loop; tiempo de equilibrado de la fase gaseosa en el loop; y tiempo de inyección en el portal de inyección del GC×GC.

Sin embargo, después de realizar una serie de pruebas preliminares se observó que la cantidad de muestra a analizar, la temperatura del horno y el tiempo de equilibrado del vial fueron los parámetros que ejercieron mayor influencia en la extracción de los compuestos volátiles. Por tanto, se optimizaron principalmente estos tres parámetros en el HS.

Las condiciones de partida seleccionadas se basaron en varios estudios en los que se había utilizado un HS estático para extraer compuestos volátiles en diferentes matrices de frutos secos, concretamente en cacahuets y nueces^{111,112}. Finalmente, exceptuando los tres parámetros a optimizar, el resto de condiciones del método de extracción fueron las siguientes:

- ✓ Temperatura del loop: temperatura del horno +10/20 °C.
- ✓ Temperatura del conducto de transferencia: temperatura del loop +10/20 °C.
- ✓ Agitación: desactivada. Al ser muestras sólidas no fue tan influyente este parámetro.
- ✓ Presión del gas portador: 22 psi.
- ✓ Presión de presurización del vial: 14 psi.
- ✓ Tiempo de presurización del vial: 0.2 min
- ✓ Tiempo de llenado del loop: 0.2 min.
- ✓ Tiempo de equilibrado: 0.05 min
- ✓ Tiempo de inyección: 1 min.

7.6.1. OPTIMIZACIÓN DEL MUESTREADOR HEADSPACE

El procedimiento para estudiar la influencia de cada uno de estos tres parámetros, en la extracción de compuestos volátiles, consistió en la modificación de uno de ellos manteniendo el resto constantes. El criterio utilizado para establecer las condiciones óptimas se basó en la señal más fuerte obtenida para una misma cantidad de muestra. Para ello, se utilizaron muestras de un mismo fruto seco, en este caso, una almendra cruda a la que se le adicionaron 100 μ L de la disolución de mezcla de patrones de trabajo.

En primer lugar, se estudió la influencia de la cantidad de muestra en la extracción con HS. Se analizaron cantidades de muestra de 0.1 a 1.0 g. Experimentalmente, se observó un incremento en la intensidad de la señal de los analitos a medida que aumentaba la cantidad de 0.1 a 0.5 g. A partir de ese valor, el incremento no fue tan notable, permaneciendo prácticamente constante. Sin embargo, a medida que la cantidad se acercaba a 1.0 g, se creaba una sobrepresión dentro del vial sellado que forzaba al septum, pudiendo llegar a estallar el propio sistema de encapsulado. Por tanto, se decidió trabajar con una cantidad de fruto seco de **0.5 g** para asegurar señales de picos intensas dejando, a su vez, bastante espacio de cabeza en el vial de 20 mL para generar suficiente fase gaseosa sin poner en peligro el sellado del vial.

A continuación, se estudiaron la temperatura y el tiempo de equilibrado del vial en el horno, en unos intervalos de trabajo de 60 a 140 $^{\circ}$ C y de 10 a 40 min, respectivamente. Los resultados mostraron que a menores temperaturas (60-80 $^{\circ}$ C) las señales de los compuestos eran muy poco intensas, mientras que a partir de 100 $^{\circ}$ C aumentaban. Sin embargo, las muestras de almendra cruda utilizadas para la optimización se tostaban en el horno del HS al aplicar la mayoría de las combinaciones de tiempo y temperatura (t-T) de equilibrado que proporcionaban las señales de pico más intensas: 40 min/100 $^{\circ}$ C, 25 min/120 $^{\circ}$ C, 40 min/120 $^{\circ}$ C, 10 min/140 $^{\circ}$ C, 25 min/140 $^{\circ}$ C, 40 min/140 $^{\circ}$ C. Por ello, esas combinaciones t-T fueron descartadas, ya que el principal objetivo consistía en diferenciar entre frutos secos crudos y tostados en función de su fracción volátil.

Finalmente, se concluyó que la combinación de t-T de equilibrado del vial en el horno de **25 min/100 $^{\circ}$ C** proporcionaba las mejores intensidades de pico evitando el tostado de las muestras durante el proceso de extracción.

7.6.2 MÉTODO PROPUESTO

Las condiciones finales del método de extracción de compuestos volátiles mediante HS estático fueron las siguientes:

- ✓ **Cantidad de muestra a analizar: 0.5 g.**
- ✓ **Temperatura del horno: 100 °C.**
- ✓ Temperatura del loop: 120 °C.
- ✓ Temperatura del conducto de transferencia: 130 °C.
- ✓ Agitación: desactivada.
- ✓ Presión del gas portador: 22 psi.
- ✓ Presión de presurización del vial: 14 psi.
- ✓ **Tiempo de equilibrado del vial en el horno: 25 min.**
- ✓ Tiempo de presurización del vial: 0.2 min
- ✓ Tiempo de llenado del loop: 0.2 min.
- ✓ Tiempo de equilibrado: 0.05 min
- ✓ Tiempo de inyección: 1 min.

7.7. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA

Como se apuntó en el capítulo anterior, en GC×GC, la separación cromatográfica depende principalmente de la combinación de columnas elegida para realizar los análisis. Por ello, en primer lugar, se llevó a cabo un estudio para evaluar qué combinación de columnas proporcionaba las mejores separaciones cromatográficas en 2D, evaluando en cada una de ellas los diferentes parámetros más influyentes.

Los cuatro parámetros que influyen principalmente en las separaciones GC×GC son: el programa de temperatura del horno, los flujos de gas portador en ambas dimensiones y el tiempo de modulación. Aunque, de todos ellos, los tres últimos muestran una mayor influencia en la separación de los analitos por GC×GC^{41,80}.

A diferencia del capítulo anterior, en este caso para establecer los valores óptimos de cada uno de los parámetros cromatográficos en cada una de las combinaciones de columnas estudiadas, se pensó en el diseño de experimentos como alternativa al estudio de los factores uno a uno, es decir, a la variación de los niveles de un factor permaneciendo fijos los demás. Se analizaron simultáneamente los efectos de todos los factores de interés, de modo que la experimentación

se realizó de forma más eficaz y se proporcionaron los resultados con un menor coste de tiempo y material.

Las condiciones cromatográficas finales se establecieron en base a diversos análisis de compuestos volátiles tanto por GC convencional^{95,114} como por GC×GC^{106,108}, a la experiencia previa en el manejo de esta técnica y a valores por defecto de parámetros específicos de cromatografía bidimensional. Por tanto, exceptuando los cuatro parámetros cromatográficos a estudiar, el resto de condiciones cromatográficas de trabajo fueron las siguientes:

- ✓ Volumen inyección: 1 µL.
- ✓ Temperatura del inyector: 250 °C.
- ✓ Inyección en modo *Split 20:1* (con división de flujo).
- ✓ Flujo de purga hacia la válvula de venteo: 50 mL/min para 0.75 min.
- ✓ Flujo de purga del septum: 3 mL/min.
- ✓ Flujo de ahorro de gas: 15 mL/min después de 2 min.
- ✓ Temperatura del FID: 260 °C.
- ✓ Flujo de hidrógeno en el FID: 20 mL/min.
- ✓ Flujo de aire en el FID: 450 mL/min.
- ✓ Flujo de nitrógeno (*make-up*) en el FID: 25 mL/min.
- ✓ Frecuencia de adquisición de datos: 200Hz/.001min.

7.7.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE LOS DIFERENTES SETS DE COLUMNAS

Se combinaron las 6 columnas seleccionadas según se indica en la **Tabla 39**, para establecer adecuadamente qué combinación proporcionaba los mejores resultados en el sistema GC×GC. Se emplearon dos tipos de sets de columnas en función de la ortogonalidad: set de ortogonalidad convencional, formado por una primera columna apolar y una segunda polar (*Set 1*); y sets de ortogonalidad inversa, donde se invirtió el orden de las columnas, primero una columna de mayor polaridad seguida de una columna de menor polaridad (*Set 2 – Set 5*). Además, dentro de los sets de ortogonalidad inversa, se estudió la influencia de la naturaleza de ambas dimensiones. Se utilizaron primeras columnas de alta polaridad con rellenos cianopropil (BPX-70) o polietilenglicol (INNOWAX) y segundas columnas apolares (ZB-5MS) o de polaridad media (ZB-35), dependiendo del porcentaje de grupos fenilo (5 ó 35%) en las columnas de relleno polidimetilsiloxano.

Tabla 39. Combinaciones de columnas utilizadas en el estudio de la separación en 2D de compuestos volátiles.

Combinación	Ortogonal		Ortogonal inversa		
	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5
Columna ¹ D	DB-5MS	BPX-70		INNOWAX	
Columna ² D	HP-INNOWAX	ZB-35	ZB-5MS	ZB-35	ZB-5MS

Por tanto, se llevó a cabo la optimización de los tres factores principales que intervenían en la separación mediante GC×GC: flujos de gas portador en ambas dimensiones y periodo de modulación (PM); mediante un CCD, 2³ con estrella y 2 puntos centrales. Los intervalos de cada uno de los tres factores estudiados fueron seleccionados tomando en consideración la teoría de separaciones multidimensionales, los trabajos descritos en bibliografía y experimentos preliminares. La matriz de 16 experiencias llevada a cabo para este diseño central compuesto y aplicada a los métodos cromatográficos de cada una de las combinaciones de columnas, se refleja en la **Tabla 40**. Toda la experimentación se realizó manteniendo constantes el resto de parámetros cromatográficos, descritos en el apartado anterior (7.7. *Determinación cromatográfica*).

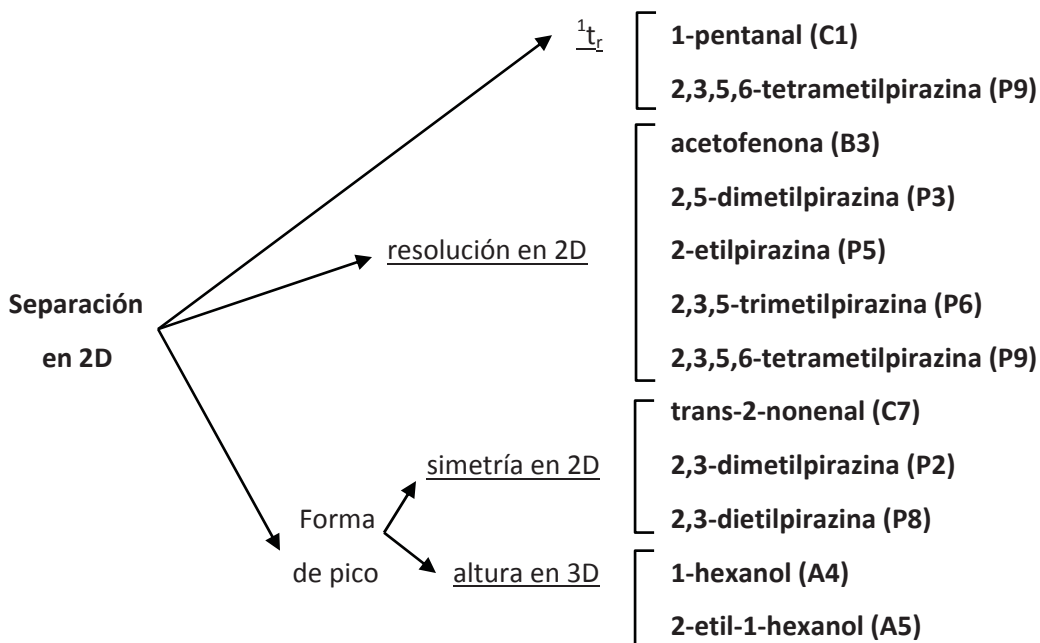
Tabla 40. Matriz de 16 experiencias para un diseño central compuesto con 3 factores y 2 puntos centrales.

Nº exp	Factores		
	Flujo ¹ D (mL/min)	Flujo 2D (mL/min)	PM (s)
1	1.0	18	1.60
2	0.4	22	1.30
3	0.4	14	1.30
4	1.0	14	1.90
5	0.7	22	1.60
6	0.4	18	1.60
7	0.7	18	1.60
8	0.4	14	1.90
9	0.7	18	1.60
10	0.7	18	1.90
11	0.7	14	1.60
12	1.0	14	1.30
13	0.4	22	1.90
14	1.0	22	1.90
15	0.7	18	1.30
16	1.0	22	1.30

PM: periodo de modulación

El criterio para caracterizar una buena separación en 2D, es decir, para la obtención de cromatogramas en 2D bien definidos mediante GC×GC se basó en unas buenas resoluciones y formas de pico en ambas dimensiones. Éstas últimas se justificaron mediante simetrías de pico en 2D y alturas de pico en 3D. Por tanto, para la elección de las variables respuesta se estudiaron 4 parámetros en cada una de las señales de pico: resolución en 2D, simetría en 2D, altura en 3D y tiempo de retención de la ¹D (¹t_r); todos ellos proporcionados por el software de tratamiento de datos *GC Image* al integrar los cromatogramas en 2D.

Finalmente y, después de realizar una serie de pruebas preliminares para elegir algunos de los compuestos volátiles más representativos, se seleccionaron 12 variables respuesta para el CCD:



Una vez terminada la experimentación, los resultados se evaluaron en función de los diagramas de Pareto obtenidos para cada una de las 12 variables respuesta seleccionadas. La **Figura 34** muestra, como ejemplo, cuatro diagramas de Pareto obtenidos para cada uno de los parámetros cromatográficos estudiados de un compuesto volátil representativo en diferentes sets de columnas empleados. Los factores más influyentes se agrupan en la parte superior de cada diagrama y los que superan la línea significativa (línea vertical roja) ejercen una influencia estadísticamente significativa de forma positiva (barras grises) o negativa (barras azules) en las variables respuesta.

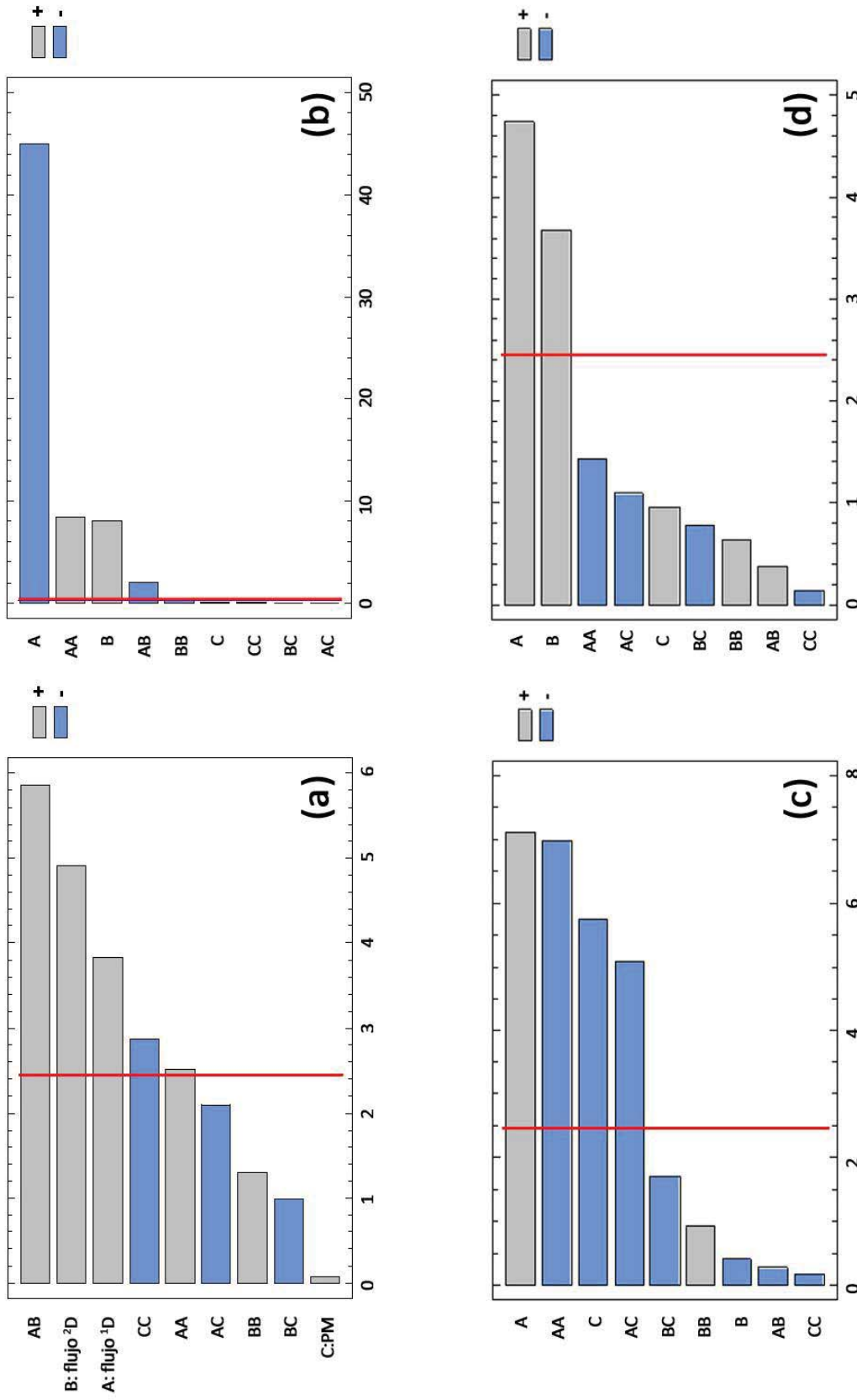


Figura 34. Diagramas de Pareto estandarizados para (a) simetría 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el Set 1; (b) ¹t_r del 1-pentanal en el Set 3; (c) resolución 2D de la 2,3,5,6-tetrametilpirazina en el Set 4; y (d) altura 3D del 1-hexanol en el Set 5. Las líneas rojas verticales indican los efectos significativos de primer y segundo orden y las interacciones para los factores: A: flujo de gas portador de la ¹D; B: flujo de gas portador de la ²D; y C: periodo de modulación (PM).

En base a los efectos de primer orden, el flujo de gas portador de la ¹D ejercía un efecto significativo en todas las variables respuesta, de forma positiva para la simetría, resolución y altura de pico (**Figura 34a, 34c, 34d**), y de forma negativa para el ¹t_r (**Figura 34b**) independientemente de la combinación de columnas, es decir, un aumento en el flujo de la ¹D mejoraba la simetría y resolución en 2D y aumentaba la altura de pico en 3D, a la vez que reducía los ¹t_r de los analitos. También se observó la influencia del flujo de gas portador de la ²D en las variables respuesta. En general, ejerció un efecto significativamente positivo también con independencia de la combinación de columnas. Por ejemplo, se observó gráficamente cómo un aumento en el flujo de la ²D mejoraba la simetría y la altura de pico (**Figura 34a, 1d**) pero aumentaban los ¹t_r (**Figura 34b**). En cuanto al periodo de modulación (PM), se percibió una menor influencia significativa de primer orden en las variables respuesta. Globalmente, se observó que un incremento en el PM empeoraba la resolución en 2D de los analitos (**Figura 34c**).

Como puede apreciarse en la **Figura 34a**, las variables significativas de la simetría en 2D para la 2,3-dimetilpirazina en el *Set 1* fueron los flujos de gas portador de ambas dimensiones, tanto individualmente (A, B) como su producto o interacción de primer orden (AB), además de los factores flujo de gas portador en la ¹D y periodo de modulación al cuadrado (AA, CC). Lo mismo se dedujo de los p-valores (p-valor<0.05) de esos factores marcados con un asterisco en la tabla del ANOVA para este parámetro cromatográfico de ese analito en el *Set 1* (**Tabla 41**).

Tabla 41. Tabla del ANOVA del ajuste llevado a cabo para la simetría en 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el Set 1.

Fuente	Suma de Cuadrados	gdl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A: flujo ¹ D	0.1932	1	0.1932	966.05	0.0205*
B: flujo ² D	0.3168	1	0.3168	1584.20	0.0160*
C: PM	0.0001	1	0.0001	0.45	0.6238
AA	0.0826	1	0.0826	413.30	0.0313*
AB	0.4512	1	0.4512	2256.25	0.0134*
AC	0.0578	1	0.0578	289.00	0.0574
BB	0.0223	1	0.0223	111.74	0.0600
BC	0.0128	1	0.0128	64.00	0.0792
CC	0.1086	1	0.1086	542.84	0.0273*
Falta de ajuste	0.0787	5	0.0157	78.72	0.0842
Error puro	0.0002	1	0.0002		
Total (corr.)	1.2806	15			

*: Diferencias significativas al 95% de probabilidad (p-valor < 0.05).

gdl: grados de libertad

R² = 93.84 %

R² (ajustada por gdl) = 84.59 %

Error estándar del est. = 0.0141

Error absoluto medio = 0.0616

Estadístico Durbin-Watson = 1.7413 (P=0.2522)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.0933

Además, a partir de la **Tabla 41**, se pudo concluir que los datos se ajustaban al modelo construido para esta variable respuesta puesto que no existía falta de ajuste (**p-valor>0.05**). También se observó que el modelo así ajustado explicaba un **93.84 %** de la variabilidad de los datos.

Siguiendo el mismo procedimiento se interpretaron los resultados para el resto de variables respuesta, confirmándose en todos los casos que no existía falta de ajuste, de modo que los modelos ajustados fueron adecuados para describir los datos. Además, los porcentajes de varianza explicados en todos los casos fueron superiores al **80%**.

Además, para cada una de las 12 variables se interpretaron las variaciones en la función respuesta para cada uno de los factores (flujos ¹D, ²D y PM). La **Figura 35** muestra, a modo de ejemplo, cuatro superficies de respuesta correspondientes a los cuatro parámetros cromatográficos representados en la **Figura 34**.

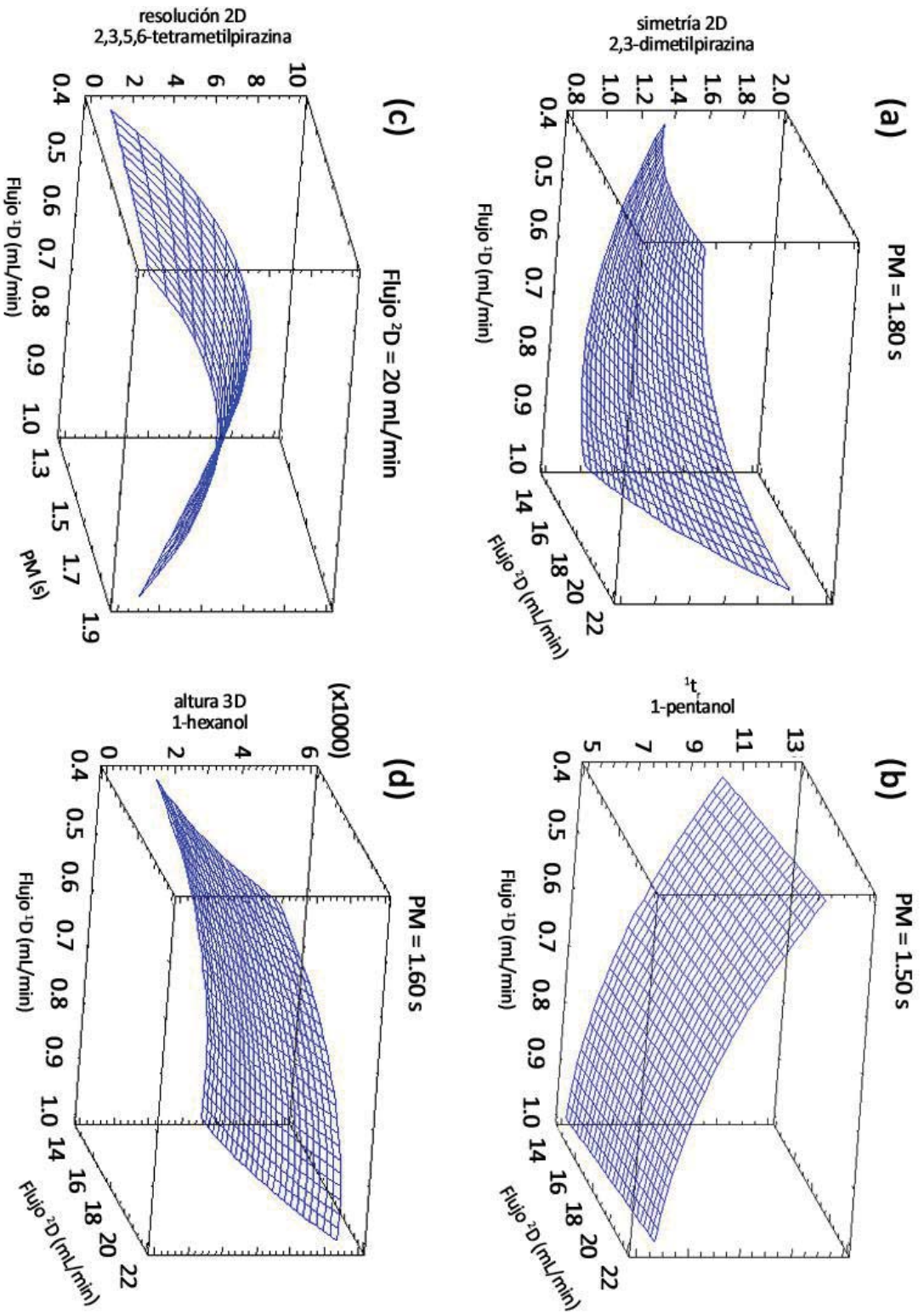


Figura 35. Superficies de respuesta estimadas para (a) simetría 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el Set 1; (b) t_r del 1-pentanol en el Set 3; (c) resolución 2D de la 2,3,5,6-tetrametilpirazina en el Set 4; y (d) altura 3D del 1-hexanol en el Set 5. Las superficies de respuesta se representan en 3D, en los intervalos estudiados de dos de los factores, manteniendo el valor del tercer factor constante. Factores: flujos de la primera y segunda dimensión (flujos ¹D y ²D) y periodo de modulación (PM).

Cada gráfica describe cómo evoluciona la respuesta de una variable cuando los valores de dos de los factores aumentan o disminuyen a lo largo de los intervalos estudiados. En la **Figura 35a**, se observa cómo la influencia del flujo de gas portador de 1D en la simetría 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el *Set 1* manifestaba un comportamiento opuesto dependiendo de si el flujo en 2D era bajo o alto. Por esta razón, en el diagrama de Pareto de esta variable (**Figura 34a**) la interacción de primer orden AB mostraba un efecto significativo sobre la variable respuesta. Para flujos en la 2D bajos, la simetría 2D disminuía a medida que incrementaba el flujo de la 1D , mientras que, utilizando flujos en la 2D superiores, la simetría 2D mejoraba al aumentar el flujo de la 1D .

En cambio, la **Figura 35b** muestra una superficie de respuesta más homogénea. Se observa cómo el 1t_r del 1-pentanol en el *Set 3* se redujo a medida que aumentaba el flujo de gas portador de la 1D y disminuía ligeramente el flujo de la 2D . Igualmente, la **Figura 35d** muestra una superficie de respuesta similar. Aunque la influencia de los factores no sea lineal con la respuesta en los intervalos estudiados, siguen la misma tendencia, es decir, un incremento tanto en el flujo de gas portador de la 1D como de la 2D provocaba un aumento en la altura en 3D del 1-hexanol en el *Set 5*, mejorando así su forma de pico.

Por último, se observa en la **Figura 35c** otra tendencia diferente en la superficie de respuesta de una variable. En este caso, la resolución 2D de la 2,3,5,6-tetrametilpirazina en el *Set 4* mejoraba a medida que aumentaba el flujo en la 1D , pero sólo hasta alcanzar un máximo que dependía, al mismo tiempo, del periodo de modulación. Por ello, la interacción de primer orden AC mostraba un efecto significativo sobre la resolución 2D de esta pirazina en su diagrama de Pareto, representado en la **Figura 34c**.

Optimización mediante Respuestas Múltiples

Después de llevar a cabo el análisis de los resultados obtenidos para cada una de las 12 variables respuesta, el siguiente paso consistió en su optimización mediante respuestas múltiples. A través de diagramas de deseabilidad se establecieron las condiciones experimentales óptimas, en cada combinación de columnas, para los tres factores significativos. Los criterios adoptados para construir las funciones de deseabilidad en todos los sets de columnas consistieron en: minimizar las respuestas de los 1t_r , para conseguir tiempos de análisis lo más cortos posibles; mantener las simetrías en 2D en un valor óptimo de 1.0; y

maximizar las alturas en 3D y las resoluciones en 2D, para conseguir buenas resoluciones y formas de pico en ambas dimensiones.

Por lo tanto, los valores óptimos de los tres factores experimentales que maximizaban la función de deseabilidad, es decir, que conseguían los mejores resultados en cuanto a la separación de compuestos volátiles en 2D, en cada combinación de columnas, aparecen detallados en la **Tabla 42**. Como ejemplo, en la **Figura 36** se muestra la superficie de respuesta estimada para la función de deseabilidad en el *Set 4*.

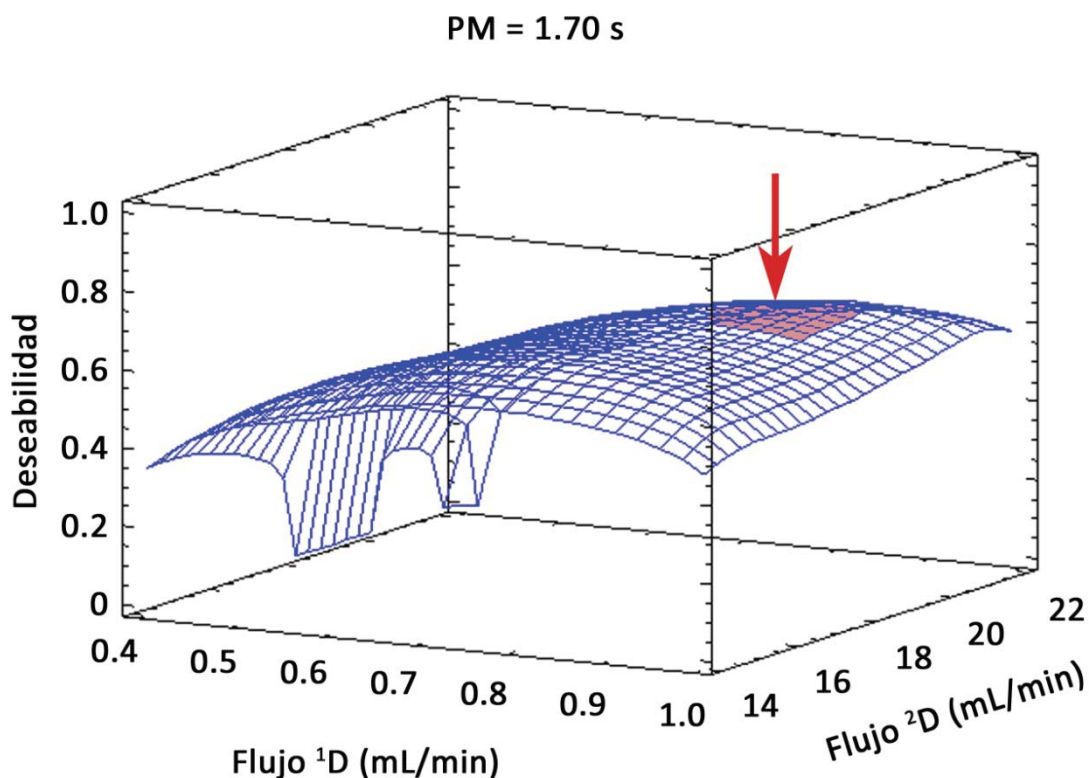


Figura 36. Superficie de respuesta para la función de deseabilidad estimada para el *Set 4*, en función de los factores: flujo de gas portador de la ¹D y de la ²D, y fijando un valor de 1.70 s para el tercero: periodo de modulación (PM). Aparece marcado el área y el valor de mayor deseabilidad.

Tabla 42. Valores óptimos de los parámetros más influyentes en GCxGC para las 5 combinaciones de columnas estudiadas.

Parámetro GCxGC	Intervalo estudiado	Valor óptimo				
		Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5
Flujo 1D (mL/min)	0.4 – 1.0	0.7	0.6	0.8	0.8	0.7
Flujo 2D mL/min)	14 – 22	17	21	21	20	20
Modulación (s)	1.30 – 1.90	1.80	1.80	1.50	1.70	1.60
Programa temperatura horno		40°C 5°C/min 130°C	40°C 5°C/min 150°C	40°C 5°C/min 150°C	40°C 5°C/min 150°C	40°C 5°C/min 150°C
		25°C/min 230°C (5min)	20°C/min 230°C (5min)	10°C/min 230°C (1min)	80°C/min 230°C (6min)	40°C/min 230°C (6min)

Además, la **Figura 36** justifica visualmente la zona donde se maximiza la deseabilidad (70%), es decir, justifica los valores óptimos de los tres factores optimizados para el *Set 4*: 0.8 mL/min, 20 mL/min y 1.70 s, recogidos en la **Tabla 42**.

La **Tabla 42** muestra también el cuarto parámetro cromatográfico influyente en las separaciones mediante GC×GC: el programa de temperaturas del horno. Este parámetro fue adaptado en cada uno de los sets de columnas en último lugar, con el fin de reducir el tiempo de análisis de cada cromatograma en 2D.

7.7.1.1. INFLUENCIA DE LA ORTOGONALIDAD DE LA COMBINACIÓN DE COLUMNAS

Una vez establecidos los métodos cromatográficos para los cinco sets de columnas analizadas (**Tabla 42**), se realizaron comparaciones de las separaciones en 2D mediante GC×GC en todos ellos. La primera de ellas se basó en la diferente ortogonalidad entre el *Set 1* (ortogonal convencional) y el resto de combinaciones, *Sets 2-5* (ortogonales de fase inversa).

Los tiempos de análisis fueron inferiores a 30 min en todas las combinaciones y, específicamente para el *Set 1*, la mayoría de los tiempos de retención en la ¹D se redujeron en torno a 5 min en comparación con el resto de combinaciones de ortogonalidad inversa. Este comportamiento se puede observar en la **Figura 37**, donde se comparan 3 cromatogramas en 3D correspondientes a la combinación ortogonal convencional (*Set 1*, **Figura 37a**) y dos combinaciones de columnas de ortogonalidad inversa (*Set 3*, **Figura 37b** y *Set 5*, **Figura 37c**).

En cuanto a orden de elución, de acuerdo con los ¹t_r de estos compuestos, los grupos de hidrocarburos y alcoholes eluyeron en el mismo orden, independientemente de la ortogonalidad del set de columnas. En cambio, los heterociclos aromáticos, derivados del benceno y del furano, mostraron diferencias en el orden de elución debidas claramente a la ortogonalidad de las combinaciones de columnas (**Figura 37**). Por último, el orden de elución de algunos carbonilos y pirazinas además de ser dependiente de la ortogonalidad de las combinaciones de columnas, también se vio influido por la composición de la columna más polar: cianopropilo (*Set 3*, **Figura 37b**) o polietilenglicol (*Set 1*, **Figura 37a** y *Set 5*, **Figura 37c**).

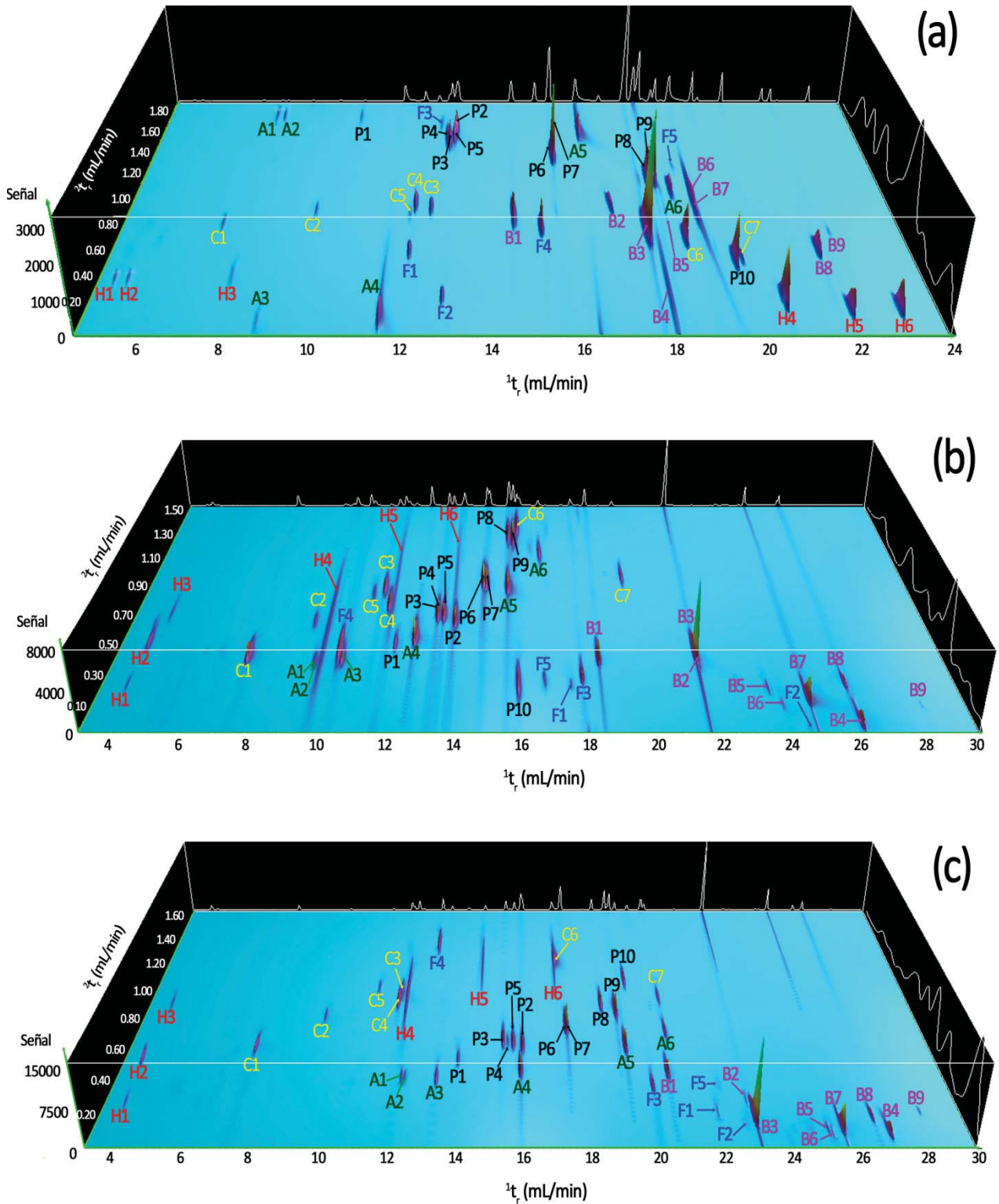


Figura 37. Cromatogramas en 3D de la mezcla de patrones de compuestos volátiles analizados empleando las condiciones finales de las 3 combinaciones de columnas: (a) Set 1, (b) Set 3 y (c) Set 5. Compuestos volátiles diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).

A pesar de que la combinación ortogonal convencional ofrecía tiempos de análisis ligeramente menores, fue más difícil conseguir una separación clara entre grupos funcionales. De forma que los **sets de ortogonalidad inversa producían mejores resultados** en términos de distinción de familias con la misma estructura química en diferentes zonas del cromatograma en 2D, facilitando la capacidad de interpretación e identificación de compuestos volátiles en muestras complejas. Por esta razón, se decidió descartar el uso de combinaciones ortogonales convencionales frente a las de ortogonalidad inversa.

Por tanto, el estudio continuó con los sets de ortogonalidad inversa, en los que se modificó la naturaleza tanto de la primera como de la segunda columna.

7.7.1.2. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LAS COLUMNAS

A continuación, se compararon los resultados entre sets de ortogonalidad inversa modificando la naturaleza de ambas columnas. Las combinaciones aparecen detalladas en la **Tabla 39** y su separación en 2D se muestra en las **Figura 38** y **Figura 39**. Para facilitar la comparación entre sets, los cromatogramas que aparecen en cada figura comparten la misma primera columna: en la **Figura 38** cianopropil y en la **Figura 39** polietilenglicol.

En general, los tiempos de análisis, t_r y órdenes de elución fueron muy similares en los cuatro sets de ortogonalidad inversa, independientemente de la naturaleza de las columnas combinadas. Sin embargo, se observó que la modificación de la primera columna proporcionaba mayores diferencias en cuanto a la separación en 2D. Los **Set 2** y **Set 3 (Figura 38)**, en los que se utilizó una primera columna cianopropil, presentaron principalmente un inconveniente, las tendencias o zonas del cromatograma en 2D específicas de cada grupo funcional no estaban lo suficientemente separadas o delimitadas unas de otras, especialmente en la región central de los cromatogramas en 2D. Es decir, las regiones de hidrocarburos, carbonilos, alcoholes y pirazinas aparecían superpuestas en las separaciones llevadas a cabo con estos **Set 2** y **Set 3 (Figura 38)**.

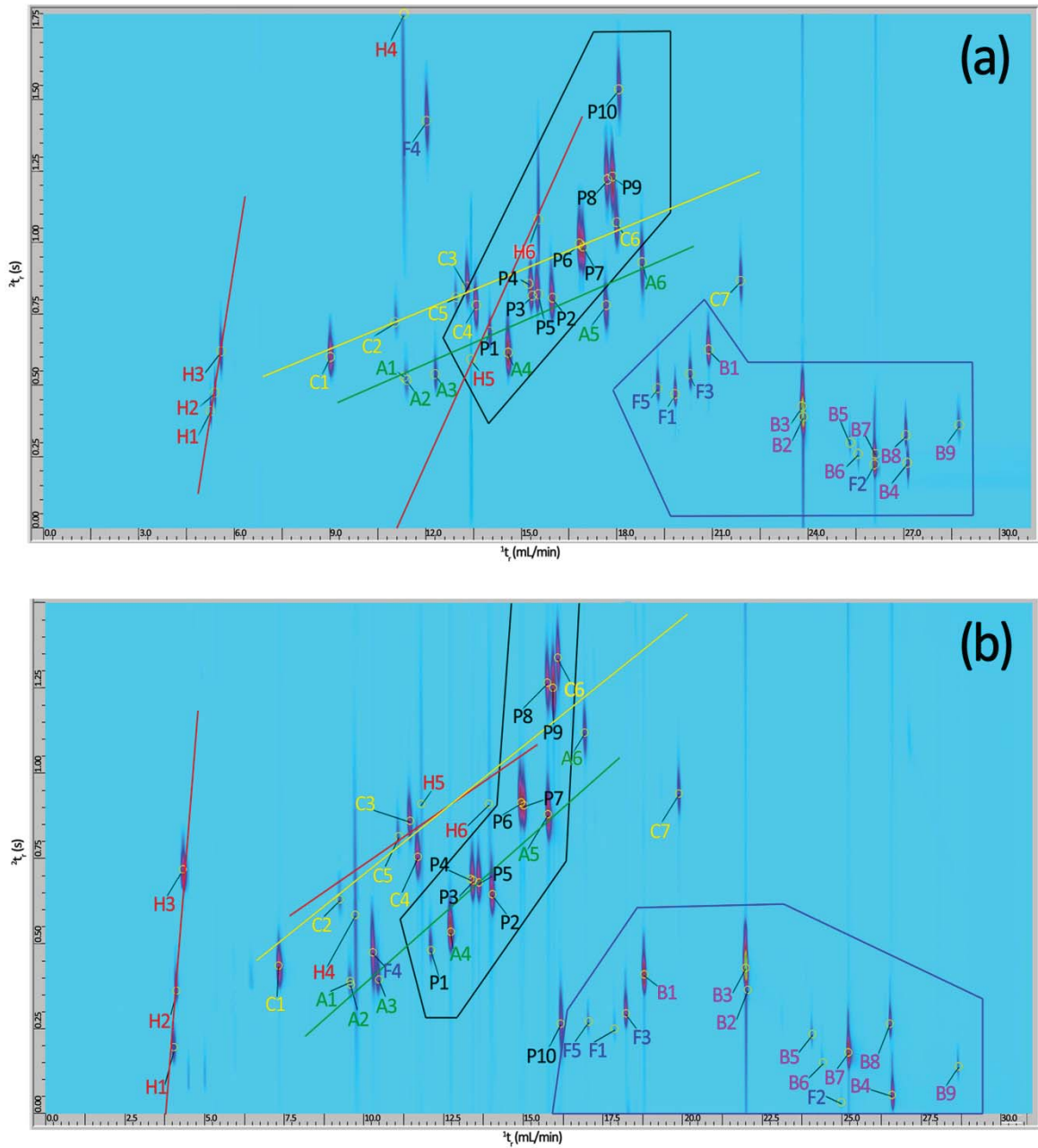


Figura 38. Cromatogramas en 2D de la mezcla de patrones de compuestos volátiles analizados empleando las condiciones finales de los 2 sets de columnas de ortogonalidad inversa con la primera dimensión cianopropil: (a) Set 2, (b) Set 3. Compuestos volátiles diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F). La tendencia de cada grupo funcional se representa mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles.

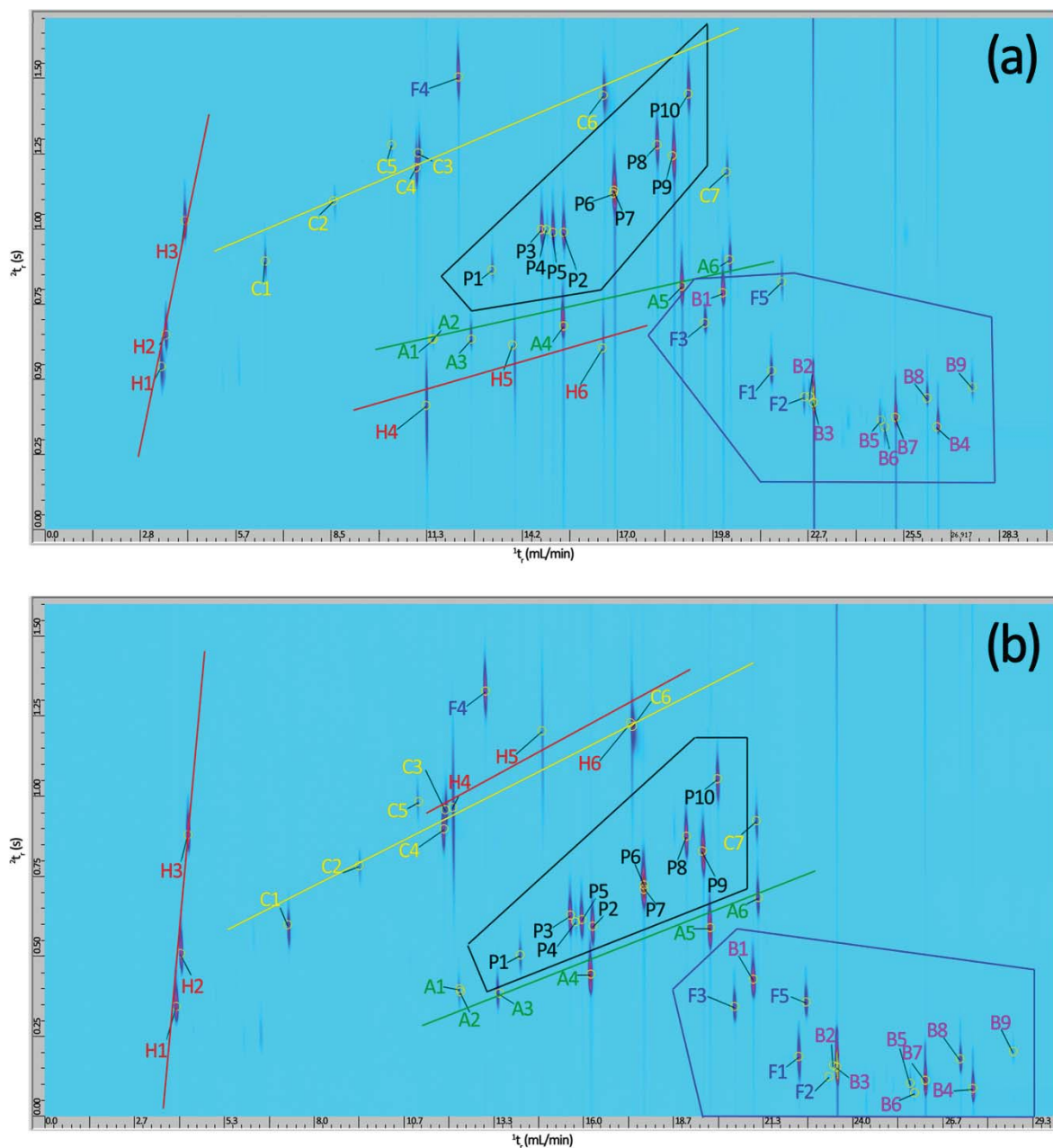


Figura 39. Cromatogramas en 2D de la mezcla de patrones de compuestos volátiles analizados empleando las condiciones finales de los 2 sets de columnas de ortogonalidad inversa con la primera dimensión polietilenglicol: (a) Set 4, (b) Set 5. Compuestos volátiles diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F). La tendencia de cada grupo funcional se representa mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles.

El grupo funcional de pirazinas mereció especial atención. Su orden de elución, en estas combinaciones ortogonales de fase inversa, fue creciente con respecto al tamaño y el número de sustituyentes que presentaban. Por otra parte, en los *Set 2* y *Set 3* coeluyeron tres parejas de pirazinas: 2,5-dimetilpirazina y 2,6-dimetilpirazina (P3+P4), 2,3,5-trimetilpirazina y 2-etil-3-metilpirazina (P6+P7), 2,3-dietilpirazina y 2,3,5,6-tetrametilpirazina (P8+P9). Sin embargo, en las otras dos combinaciones cuya primera dimensión fue una columna polietilenglicol, *Set 4* y *Set 5* (**Figura 39**), se logró una separación completa de las dos primeras parejas de pirazinas solapadas (P3, P4, P8, P9).

Por todo ello, se concluyó que el uso de combinaciones de **ortogonalidad inversa con una primera columna de polietilenglicol** (*Set 4* y *Set 5*) era **más efectivo** para llevar a cabo separaciones en 2D de diferentes grupos de compuestos volátiles.

Centrándonos únicamente en estas dos combinaciones, *Set 4* y *Set 5*, el empleo de una segunda columna de menor polaridad (*Set 5*; **Figura 39b**) se tradujo en un mayor número de solapamientos entre compuestos volátiles, por ejemplo, tetradecano y nonanal (H6+C6); además de una peor separación en el cromatograma en 2D entre las regiones de hidrocarburos y carbonilos. Por tanto, se eligió el **Set 4 ya que proporcionaba mejores separaciones de compuestos volátiles en 2D**, a la vez que facilitaba la interpretación de las tendencias de los diferentes grupos funcionales, es decir, facilitaba la interpretación de los perfiles de la fracción volátil en matrices de frutos secos crudos y tostados.

7.7.2. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Las condiciones cromatográficas finales empleadas para la determinación de los compuestos volátiles más representativos de la fracción volátil de los frutos secos crudos y tostados, empleando el *Set 4*: INNOWAX (polar alta) × ZB-35 (polar media), fueron las siguientes:

- ✓ Volumen inyección: 1 µL.
- ✓ Temperatura del inyector: 250 °C.
- ✓ Inyección en modo *Split 20:1* (con división de flujo).
- ✓ **Flujo de hidrógeno en la primera dimensión: 0.8 mL/min.**
- ✓ **Flujo de hidrógeno en la segunda dimensión: 20 mL/min.**
- ✓ Flujo de purga hacia la válvula de venteo: 50 mL/min para 0.75 min.
- ✓ Flujo de purga del septum: 3 mL/min.

- ✓ Flujo de ahorro de gas: 15 mL/min después de 2 min.
- ✓ **Periodo de modulación: 1.70 s.**
- ✓ **Programa de temperatura del horno:**

	Pendiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Inicialmente</i>		40	0
<i>Rampa 1</i>	5	150	0
<i>Rampa 2</i>	80	230	6

- ✓ Temperatura del FID: 260 °C.
- ✓ Flujo de hidrógeno en el FID: 20 mL/min.
- ✓ Flujo de aire en el FID: 450 mL/min.
- ✓ Flujo de nitrógeno (*make-up*) en el FID: 25 mL/min.
- ✓ Frecuencia de adquisición de datos: 200Hz/.001min.

La **Tabla 43** muestra los 43 compuestos volátiles estudiados con los dos tiempos de retención para su determinación cromatográfica: 1t_r (min) y 2t_r (s).

Tabla 43. Lista de los 43 compuestos volátiles clasificados por orden de elución en la primera dimensión, con sus abreviaturas y sus tiempos de retención en la primera (¹t_r) y segunda (²t_r) dimensión.

Abreviatura	Compuesto volátil	¹ t _r (min)	² t _r (s)
H1	pentano	3.5	0.54
H2	hexano	3.6	0.64
H3	heptano	4.2	1.02
C1	1-pentanal	6.5	0.89
C2	1-hexanal	8.6	1.09
C5	3-heptanona	10.3	1.27
C4	2-heptanona	11.0	1.20
C3	1-heptanal	11.1	1.25
H4	dodecano	11.3	0.41
A1	2-metil-1-butanol	11.5	0.63
A2	3-metil-1-butanol	11.6	0.63
F4	2-pentilfurano	12.3	1.50
A3	1-pentanol	12.7	0.63
P1	2-metilpirazina	13.3	0.86
H5	tridecano	13.9	0.61
P3	2,5-dimetilpirazina	14.7	0.99
P4	2,6-dimetilpirazina	14.9	0.99
P5	2-etilpirazina	15.1	0.98
P2	2,3-dimetilpirazina	15.4	0.98
A4	1-hexanol	15.4	0.67
H6	tetradecano	16.6	0.60
C6	1-nonanal	16.6	1.44
P6	2,3,5-trimetilpirazina	16.9	1.11
P7	2-etil-3-metilpirazina	16.9	1.12
P8	2,3-dietilpirazina	18.2	1.27
P9	2,3,5,6-tetrametilpirazina	18.6	1.24
A5	2-etil-1-hexanol	18.9	0.80
P10	2,3-dietil-5-metilpirazina	19.1	1.44
F3	2-furilmetil cetona	19.6	0.68
B1	benzaldehído	20.1	0.78
C7	trans-2-nonenal	20.2	1.18
A6	linalol	20.3	0.89
F1	alcohol furfurílico	21.6	0.52
F5	2-furaldehído	21.9	0.82
F2	γ-butirolactona	22.6	0.44
B2	fenilacetaldehído	22.7	0.44
B3	acetofenona	22.8	0.42
B5	guayacol	24.8	0.36
B6	alcohol bencílico	24.9	0.34
B7	alcohol feniletílico	25.2	0.37
B8	4-etilguayacol	26.2	0.43
B4	p-cresol	26.5	0.34
B9	4-vinilguayacol	27.5	0.47

Abreviaturas grupos funcionales: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).

7.8. APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES

Se analizaron muestras comerciales de cuatro frutos secos crudos (n=6) y tostados (n=6) pertenecientes a la misma variedad, elegidos aleatoriamente y comprados en mercados locales de la provincia de Valladolid. Las almendras (*Prunus amygdalus* L. var. *dulcis*) pertenecían a la variedad española *Largueta*, las avellanas (*Corylus avellana* L.) a la variedad también española *Negreta*, los cacahuetes (*Arachis hypogaea* L.) a la variedad *Española* y las pipas de girasol (*Helianthus annuus* L.) a la variedad *MAS 97A*.

Las muestras se pelaron y molieron hasta conseguir un tamaño de partícula homogéneo, almacenándose a +4 °C hasta ser analizadas. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado en un periodo no superior a una semana a partir de su preparación.

Proceso de tostado a escala de laboratorio

Se tomaron muestras de cada uno de los frutos secos crudos pelados y se sometieron a tratamientos térmicos con diferentes condiciones de tiempo y temperatura de tostado (t-T) en un horno ventilado. Los intervalos de t-T estudiados, adecuados para obtener unas características sensoriales finales deseables, fueron de 5-40 min a 150-170 °C, respectivamente, intentando reproducir las condiciones de tostado industrial pero a escala de laboratorio^{95,100,104,110}. A continuación, estas muestras se molieron, almacenaron y analizaron en las mismas condiciones que el resto de muestras.

7.8.1. DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL EN FRUTOS SECOS CRUDOS Y TOSTADOS

Una vez optimizado el método HS-GC×GC-FID con la combinación de columnas del *Set 4*, INNOWAX (polar alta) × ZB-35 (polar media), se aplicó para llevar a cabo la identificación de la fracción volátil de las muestras de frutos secos crudos y tostados.

A partir del cromatograma de la mezcla de patrones de los 43 volátiles analizados mediante el método cromatográfico optimizado (**Figura 39a**), se creó una plantilla de referencia para identificar, de forma rápida y sencilla, los volátiles más representativos en cualquier muestra analizada aplicando el mismo método.

La **Figura 40** muestra la plantilla de referencia creada en base a los tiempos de retención (t_r , t_r) de sus correspondientes patrones individuales analizados con el método propuesto.

La identificación de los analitos en cada una de las muestras reales comenzó con un análisis mediante HS-GC×GC-FID. A continuación, a través del software *GC Image* se establecieron correspondencias entre los picos presentes en la plantilla de referencia y los picos detectados en cada cromatograma en 2D. De esta forma, se fue confirmando la presencia o ausencia de cada uno de los compuestos volátiles en cada muestra analizada. Por último, los picos identificados se integraron, determinándose su composición relativa mediante el volumen de pico.

La identificación mediante plantilla de referencia y posterior integración se aplicó a las muestras de frutos secos crudos, a las mismas muestras crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado y, finalmente, a las muestras de frutos secos tostados. De esta forma, también se pudo llevar a cabo un análisis semi-cuantitativo, con el fin de determinar los cambios en los porcentajes de volumen de cada compuesto analizado en función de las condiciones de tostado.

Por tanto, en los dos apartados siguientes, se ha llevado a cabo:

- ◆ Primero, la evaluación de las muestras tostadas comerciales, a través del comportamiento de la fracción volátil de ellas en comparación con el estudio del tostado de muestras crudas a escala de laboratorio.

- ◆ Segundo, la caracterización global de cada una de las cuatro matrices crudas y tostadas, también a través de los cambios producidos en su fracción volátil.

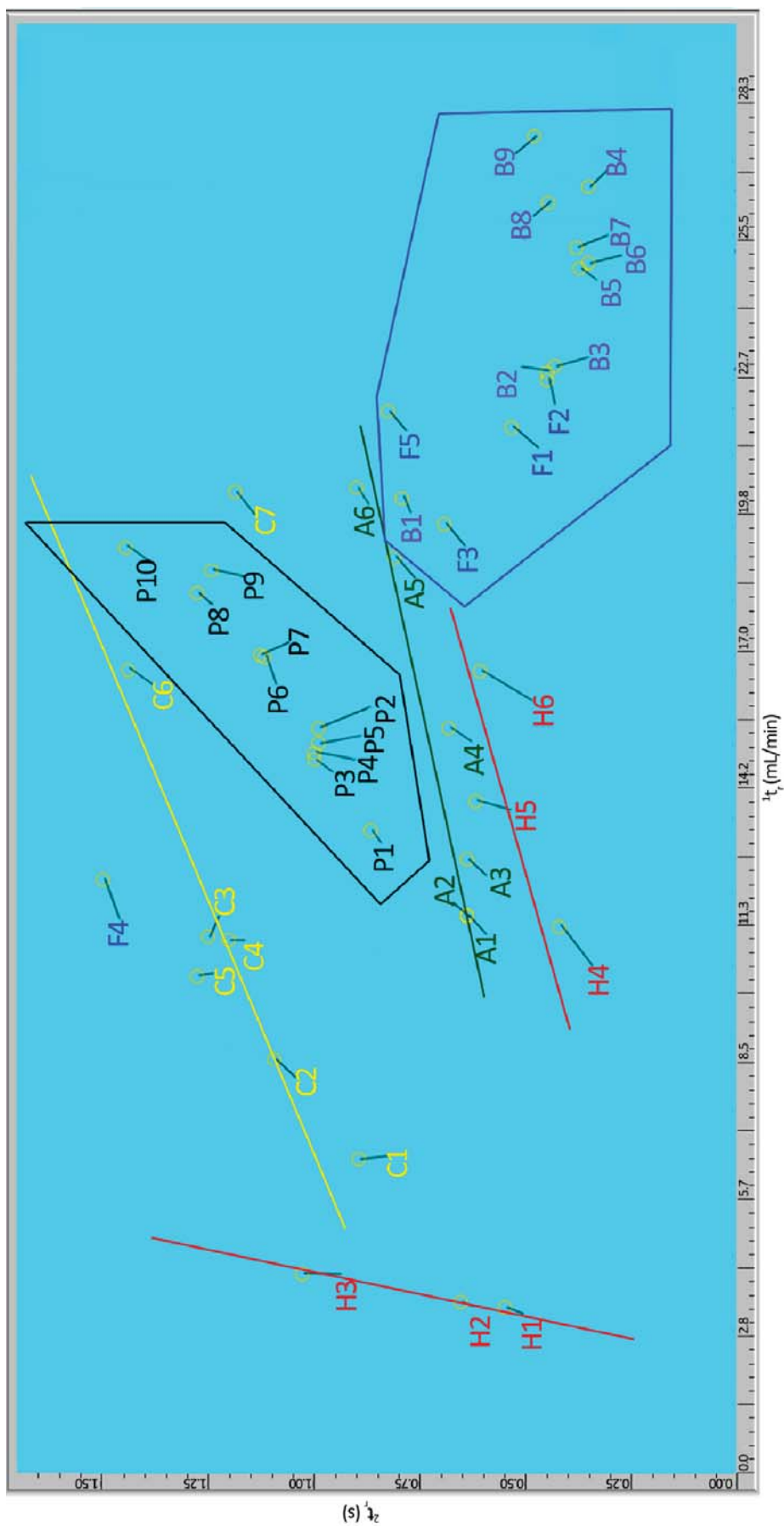


Figura 40. Plantilla de identificación en 2D de los 43 compuestos volátiles analizados mediante el método cromatográfico establecido para el Set 4. Aparecen diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F). La tendencia de cada grupo funcional se representa mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles.

7.8.1.1. EVALUACIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE LOS FRUTOS SECOS TOSTADOS COMERCIALES

Para establecer cuáles de los compuestos volátiles identificados en cada matriz podrían considerarse posibles marcadores potenciales del tostado, se estudiaron las muestras de frutos secos tostados comerciales y se compararon con las muestras crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio. Éstas últimas permitieron establecer y/o distinguir el comportamiento, es decir, la presencia o ausencia, así como el volumen de pico de cada compuesto volátil durante el proceso de tostado y, al mismo tiempo, estimar de forma aproximada las condiciones de tostado industrial para cada una de las matrices y muestras de frutos secos estudiadas; las cuales nunca aparecen especificadas por los fabricantes.

Las cuatro tablas siguientes, de la **Tabla 44** a la **Tabla 47**, muestran el comportamiento (*presencia*, en amarillo, o *ausencia*, en blanco) de los analitos en las muestras crudas de los cuatro frutos secos, sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio. Además, se estiman las condiciones de t-T para todas las muestras tostadas comerciales en cada matriz (flechas en tonos naranja/marrón), en base a esa presencia o ausencia de compuestos volátiles en ellas.

Tabla 44. Estudio del comportamiento (presencia/ausencia) de los compuestos volátiles en las muestras de almendras crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio y estimación de las condiciones de t-T de las muestras tostadas comerciales.

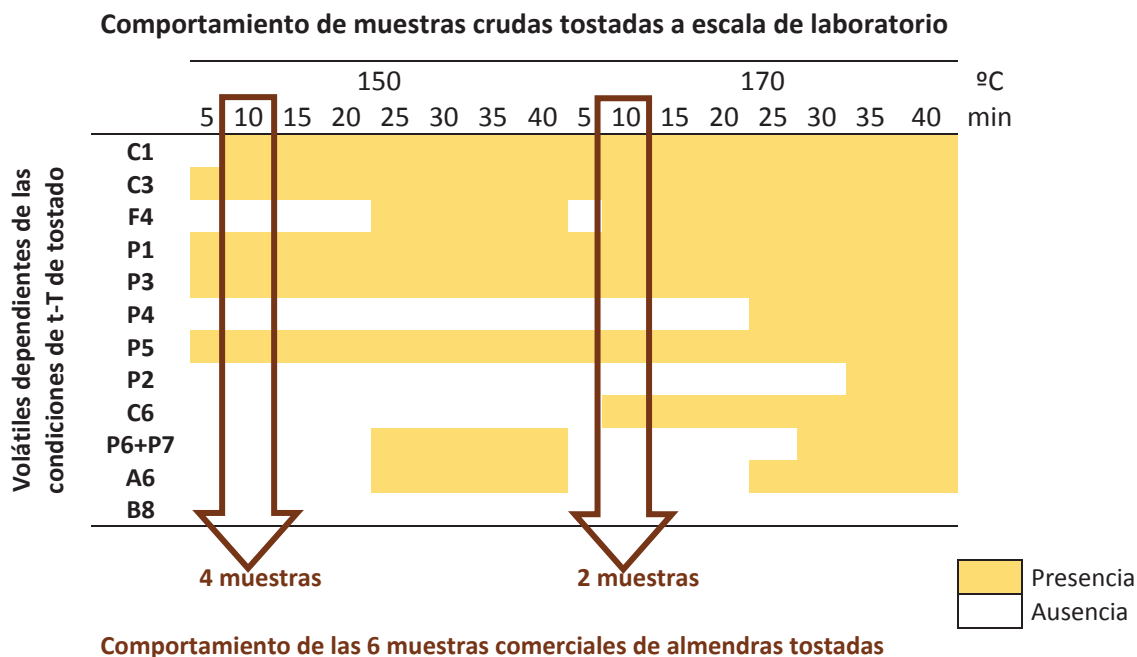
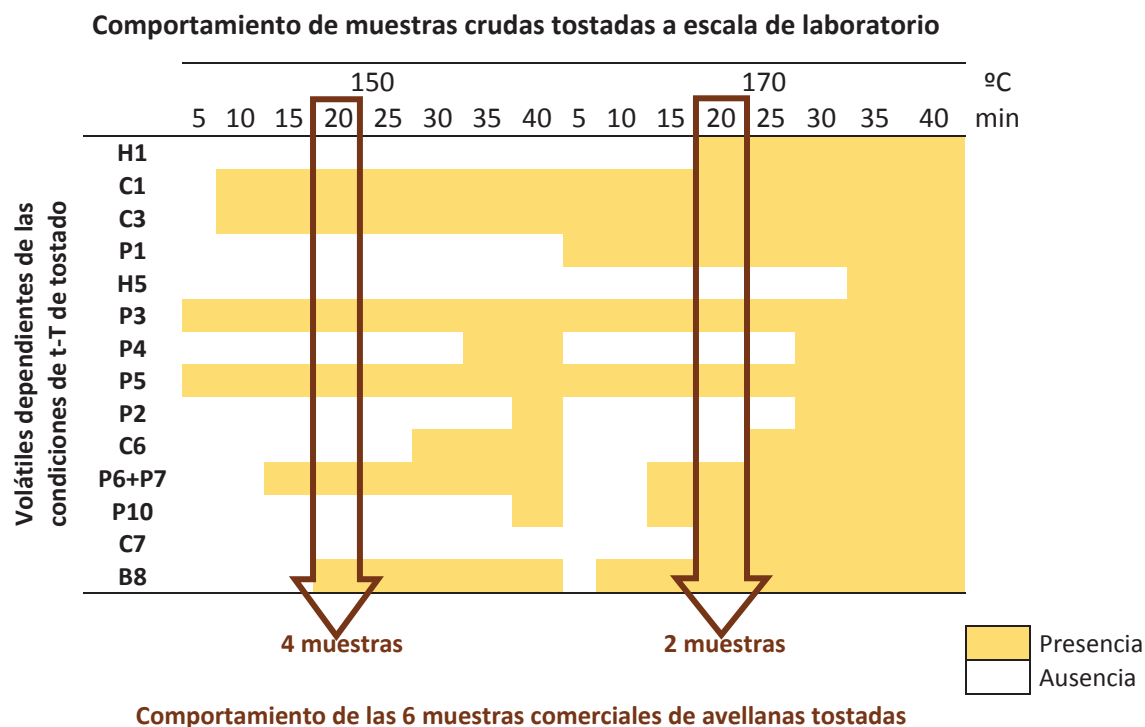


Tabla 45. Estudio del comportamiento (presencia/ausencia) de los compuestos volátiles en las muestras de avellanas crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio y estimación de las condiciones de t-T de las muestras tostadas comerciales.



Se dedujo a partir de las tablas: **Tabla 44 - Tabla 47**, es decir, de la comparación entre las muestras tostadas y el estudio del tostado a escala de laboratorio que, globalmente, las muestras tostadas comerciales (*R*, *roasted*) se podían agrupar en dos conjuntos (de 4 y 2 muestras, respectivamente, para todas las matrices excepto para el cacahuete, en el que aparecen dos grupos de 3 muestras) cuyas diferencias, aunque mínimas, residían en la composición de la fracción volátil de cada uno de ellos. Por tanto, a partir de esta composición de volátiles se pudieron estimar de forma aproximada las condiciones de tostado para cada grupo, pasando a denominarse en cada matriz como *R1*, para el grupo cuyas condiciones de t-T de tostado fueron más suaves, y *R2*, para el grupo sometido a condiciones más intensas. A modo de ejemplo, el grupo *R1* de las pipas de girasol estaría formado por 2 muestras, y el grupo *R2* por 4 muestras (**Tabla 47**).

La **Tabla 48** resume esta clasificación de las muestras tostadas de acuerdo con el proceso de tostado estimado en función de la composición de la fracción volátil.

Tabla 48. Condiciones estimadas de tostado en las muestras tostadas comerciales.

T (°C)	t (min)	Almendra	Avellana	Cacahuete	Pipa girasol
150	5				
	10	R1 (4 muestras)			
	15				
	20		R1 (4 muestras)	R1 (3 muestras)	
	25				
	30				
	35				
40					
170	5				
	10	R2 (2 muestras)			
	15				
	20		R2 (2 muestras)	R2 (3 muestras)	R1 (2 muestras)
	25				R2 (4 muestras)
	30				
	35				
40					

R1: condiciones estimadas de t-T de tostado suave. *R2*: condiciones estimadas de t-T de tostado más intenso.

Experimentalmente se observó que, las almendras tostadas fueron procesadas bajo condiciones de tostado más suaves que el resto de matrices mientras que, en general, las pipas de girasol requerían procesos de tostado más intensos.

A través de la **Tabla 44** a la **Tabla 47**, también se estudió el comportamiento de los analitos dependientes del proceso de tostado en cada matriz de fruto seco. Se observó que los compuestos volátiles se clasificaron en tres grupos diferentes según su comportamiento (presencia o ausencia) en las muestras analizadas: **i)** no detectados; **ii)** detectados independientemente del nivel de tostado o comunes de la matriz; **iii)** detectados en función del proceso de tostado. Además, a partir de ellas, se creó la **Tabla 49**, en la que se clasifican los compuestos volátiles dependientes del proceso de tostado en función de su comportamiento en las muestras tostadas de los cuatro frutos secos.

Tabla 49. Compuestos volátiles dependientes del proceso de tostado, caracterizados por su presencia (R , $R2$) o a ausencia ($(t-T) < R$, $(t-T) > R2$) en las muestras tostadas comerciales.

Condiciones de tostado	Compuesto volátil			
	Almendra	Avellana	Cacahuete	Pipa girasol
$(t-T) < R$				A1
				B1
				B7
			H1	
		C1	C1	C1
				C4
		C3	C3	C3
				F4
	R	P1		P1
		P3	P3	P3
		P4	P4	
	P5	P5	P5	
		P6+P7	P6+P7	
		B3		
		B8		
$R2$		H1		
	F4		F4	
		P1		
	C6		C6	C6
		P10		
		C7		
$(t-T) > R2$		H5		
	P4	P4		
				P5
	P2	P2	P2	P2
	P6+P7			
	A6			
		C6		

R : condiciones generales que engloban ambos grupos de muestras ($R1$ y $R2$). $R1$: condiciones estimadas de t-T de tostado suave. $R2$: condiciones estimadas de t-T de tostado más intenso. $((t-T) < R2)$: condiciones de t-T de tostado inferiores a las empleadas en ambos grupos de muestras comerciales. $((t-T) > R2)$: condiciones de t-T de tostado superiores a las empleadas en el grupo más intenso, $R2$.

La **Tabla 49** muestra, por ejemplo, que las pipas de girasol tostadas contenían necesariamente los 6 compuestos volátiles: 2-heptanona (C4), 2-pentilfurano (F4), 2-metilpirazina (P1), 2,5-dimetilpirazina (P3), 2,6-dimetilpirazina (P4), 2,3,5-trimetilpirazina y 2-etil-3-metilpirazina (P6+P7), a la vez que presentaban una ausencia obligatoria de los analitos generados en condiciones de tostado inferiores a las industriales, como son 2-metil-1-butanol (A1), benzaldehído (B1) y alcohol fenilético (B7); y superiores, 2,3-dimetilpirazina (P2) y 2-etilpirazina (P5); quedando únicamente el 1-nonanal (C6) como volátil indicativo del nivel de tostado, es decir, de las diferencias entre la composición de la fracción volátil de las muestras comerciales de pipas de girasol distinguidas como *R1* y *R2*.

7.8.1.2. CARACTERIZACIÓN DE CADA FRUTO SECO EN FUNCIÓN DE SU FRACCIÓN VOLÁTIL

El estudio detallado de las muestras correspondientes a los cuatro frutos secos aparece resumido en la **Tabla 50**, donde se muestran las composiciones medias, expresadas como porcentajes en volumen (% V), de cada analito identificado en los tres tipos de muestras comerciales: crudas y tostadas *R1* y *R2*.

A partir del análisis semi-cuantitativo, se determinaron los cambios en los porcentajes de volumen de cada compuesto volátil identificado en las muestras. De esta forma, se caracterizaron las cuatro matrices en función de la composición de la fracción volátil de cada fruto seco crudo y tostado.

Se caracterizaron de forma individual cada uno de los frutos secos estudiados a través de los cambios de su fracción volátil, mostrados en la **Tabla 50**. A continuación, se exponen las conclusiones matriz a matriz.

Almendra

Se observaron **doce compuestos volátiles** en esta matriz **independientemente del estado crudo o tostado** de las muestras, pero en porcentajes diferentes. Cinco de ellos experimentaron un incremento en su concentración con el proceso de tostado (hexano (H2), 1-hexanal (C2), 2-heptanona (C4), 3-heptanona (C5) y 1-pentanol (A3)). El 1-hexanal fue el volátil que experimentó el incremento más notable, debido a que es considerado uno de los principales productos de la oxidación durante el proceso de tostado de los frutos secos.

Tabla 50. Composiciones relativas (% V) y desviaciones estándar relativas (% RSD) (n=3) de los compuestos volátiles identificados en cada una de las muestras comerciales analizadas: crudas, tostadas en condiciones suaves (R1) y tostadas en condiciones más intensas (R2).

Compuesto Volátil	Almendra % V (% RSD)			Avellana % V (% RSD)			Cacahuete % V (% RSD)			Pipa girasol % V (% RSD)		
	Cruda	R1	R2	Cruda	R1	R2	Crudo	R1	R2	Cruda	R1	R2
H1	nd	nd	nd	nd	nd	6.2 (7.2)	nd	1.7 (6.8)	9.1 (4.8)	3.3 (10.1)	15.2 (4.2)	14.4 (6.4)
H2	9.9 (2.5)	13.2 (6.3)	13.8 (4.8)	3.2 (5.6)	19.4 (4.8)	18.3 (4.6)	15.9 (4.8)	9.2 (7.2)	0.4 (5.0)	7.0 (4.8)	4.6 (2.1)	0.4 (4.9)
C1	nd	1.5 (9.0)	1.4 (9.2)	nd	2.2 (7.5)	3.7 (6.1)	nd	1.1 (9.1)	12.6 (4.7)	2.2 (6.8)	29.2 (4.8)	34.2 (7.8)
C2	2.3 (4.6)	14.3 (7.5)	21.2 (8.4)	5.8 (4.8)	19.5 (3.7)	33.2 (2.1)	0.4 (7.2)	14.5 (4.0)	19.1 (4.8)	10.4 (2.4)	20.3 (6.9)	24.7 (9.8)
C5	1.0 (3.1)	2.0 (6.2)	1.9 (6.9)	nd	nd	nd	0.8 (8.0)	nd	nd	nd	nd	nd
C4	13.4 (4.8)	24.8 (3.9)	24.1 (4.2)	nd	nd	nd	28.6 (2.4)	40.4 (3.1)	39.3 (7.2)	nd	0.4 (5.7)	1.2 (4.6)
C3	nd	3.5 (7.6)	3.9 (5.7)	nd	1.4 (7.6)	9.9 (3.9)	nd	0.6 (8.7)	2.1 (5.8)	nd	nd	nd
A1	7.7 (6.9)	3.3 (4.3)	1.8 (8.9)	5.8 (6.7)	3.1 (5.9)	0.3 (10.0)	5.0 (3.4)	0.9 (4.9)	0.2 (9.0)	6.5 (6.4)	nd	nd
A2	nd	nd	0.9 (10.4)	4.5 (4.7)	2.0 (6.1)	0.1 (9.9)	3.4 (6.1)	0.8 (8.9)	0.1 (4.7)	nd	nd	nd
F4	nd	nd	9.5 (4.2)	nd	nd	nd	nd	nd	2.9 (5.1)	nd	0.6 (8.1)	0.8 (7.2)
A3	3.0 (4.2)	4.2 (2.9)	0.8 (8.7)	0.8 (11.0)	1.8 (7.8)	3.3 (5.8)	5.3 (3.7)	8.3 (4.6)	9.0 (6.1)	12.3 (4.2)	15.6 (6.4)	16.0 (6.8)
P1	nd	0.7 (4.9)	1.2 (9.7)	nd	nd	1.1 (6.9)	nd	0.3 (10.7)	0.3 (2.8)	nd	1.0 (4.2)	1.1 (8.1)
P3	nd	1.0 (8.6)	1.2 (9.7)	nd	6.3 (2.8)	7.9 (7.1)	nd	0.9 (6.7)	0.8 (4.7)	nd	4.0 (3.6)	4.2 (6.9)
P4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2 (10.0)	0.1 (6.8)	nd	0.1 (9.1)	0.2 (7.2)
P5	nd	0.3 (2.2)	0.7 (10.5)	nd	0.5 (9.7)	0.5 (9.8)	nd	0.1 (6.9)	0.2 (9.1)	nd	nd	nd
P2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A4	5.0 (6.2)	2.9 (4.1)	2.3 (4.5)	1.8 (8.1)	3.0 (2.8)	3.3 (4.8)	20.9 (2.9)	14.8 (4.8)	0.6 (4.6)	6.3 (3.7)	1.2 (8.0)	0.1 (6.3)
C6	nd	nd	0.8 (9.6)	nd	nd	nd	nd	nd	1.6 (5.0)	nd	nd	0.6 (7.4)
P6+P7	nd	nd	nd	nd	2.1 (4.7)	2.0 (7.8)	nd	0.1 (6.0)	0.6 (6.0)	nd	0.8 (6.7)	1.3 (5.8)
A5	2.4 (7.0)	1.6 (8.7)	1.4 (7.5)	4.8 (6.4)	2.0 (7.4)	0.4 (9.1)	2.3 (4.8)	1.3 (7.2)	0.1 (7.2)	11.8 (5.9)	2.1 (4.8)	0.1 (6.9)
P10	nd	nd	nd	nd	nd	0.3 (8.7)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B1	2.7 (2.7)	1.4 (4.8)	1.1 (5.0)	6.5 (4.0)	3.1 (4.8)	0.4 (7.5)	0.9 (9.0)	0.5 (7.2)	0.1 (6.5)	1.0 (4.7)	nd	nd
C7	nd	nd	nd	nd	nd	0.3 (10.4)	nd	nd	0.2 (6.5)	nd	nd	nd
A6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.5 (8.2)	nd	nd	nd	nd	nd
F2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.0 (5.0)	1.8 (6.1)	0.3 (7.9)
B2	18.3 (4.6)	14.5 (7.1)	11.6 (5.7)	24.8 (2.4)	19.7 (3.9)	6.5 (4.9)	11.4 (3.0)	3.0 (4.8)	0.1 (4.5)	21.3 (4.2)	2.6 (5.9)	0.2 (6.0)
B3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.4 (6.4)	0.2 (3.9)	nd	nd	nd
B6	30.1 (8.9)	10.3 (6.5)	1.5 (7.9)	28.6 (2.7)	8.3 (5.7)	0.3 (4.0)	1.5 (7.2)	0.6 (5.7)	0.2 (7.0)	8.1 (6.0)	0.6 (5.8)	0.2 (5.5)
B7	2.0 (9.4)	0.5 (9.7)	0.4 (8.9)	13.4 (2.8)	3.0 (4.9)	0.4 (5.9)	2.1 (5.1)	0.3 (8.1)	0.1 (8.6)	2.8 (9.1)	nd	nd
B8	2.4 (6.2)	nd	nd	nd	2.4 (7.4)	2.0 (6.9)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: compuesto volátil no detectado.

El proceso de tostado también causó una disminución en los porcentajes en volumen de siete analitos, todos ellos alcoholes y derivados bencénicos (2-metil-1-butanol (A1), 1-hexanol (A4), 2-etil-1-hexanol (A5), benzaldehído (B1), fenilacetaldehído (B2), alcohol bencílico (B6) y alcohol feniletílico (B7)). De todos ellos, destacó la presencia del derivado bencénico benzaldehído (B1), puesto que su característico olor a almendras resulta ampliamente conocido.

Únicamente un compuesto, el **4-etilguayacol** (B8), fue **característico de las muestras de almendra cruda**. Por su parte, **siete compuestos volátiles** fueron **identificados exclusivamente en muestras de almendra tostada**, cinco de los cuales fueron detectados en todas ellas (R1 y R2). Principalmente se trataba de aldehídos, como el 1-pentanal (C1) y 1-heptanal (C3), normalmente aldehídos de bajo molecular, derivados de una serie de reacciones enzimáticas a partir de dos ácidos grasos esenciales, ácidos linoléico y linolénico, mediante la acción de la lipoxigenasa; y pirazinas, es decir, heterociclos aromáticos nitrogenados producidos durante la reacción de Maillard y característicos de las matrices tostadas, tales como 2-metilpirazina (P1), 2-etilpirazina (P5) y 2,5-dimetilpirazina (P3). Los otros dos volátiles, 2-pentilfurano (F4) y 1-nonanal (C6) sólo fueron identificados en las muestras tostadas R2.

Avellana

Todas las muestras de avellanas, tanto crudas como tostadas, contenían **once compuestos volátiles** en diferentes proporciones. La composición relativa de cuatro de ellos (hexano (H2), 1-hexanal (C2), 1-pentanol (A3) y 1-hexanol (A4)) aumentó progresivamente con el tostado. Sin embargo, los otros siete analitos mostraron una disminución en su señal, que fue especialmente relevante en las muestras cuyas condiciones de tostado fueron más intensas, R2. En este caso, al igual que en las almendras, también se trató de alcoholes y derivados bencénicos: 2-metil-1-butanol (A1), 3-metil-1-butanol (A2), 2-etil-1-hexanol (A5), benzaldehído (B1), fenilacetaldehído (B2), alcohol bencílico (B6) y alcohol feniletílico (B7).

Se identificaron **once compuestos volátiles exclusivamente en las muestras de avellanas tostadas**. Seis fueron encontrados en ambos grupos R1 y R2, especialmente aldehídos y pirazinas: 1-pentanal (C1), 1-heptanal (C3), 2,5-dimetilpirazina (P3), 2-etilpirazina (P5), 2,3,5-trimetilpirazina y 2-etil-3-metilpirazina, que se superponía (P6+P7) y 4-etilguayacol (B8). El resto de volátiles fueron detectados únicamente en las muestras expuestas a un tostado más intenso, R2: pentano (H1), trans-2-nonenal (C7), 2-metilpirazina (P1) y 2,3-dietil-5-metilpirazina (P10).

Cacahuete

Se detectaron **doce compuestos volátiles comunes en todas las muestras de cacahuete** crudos y tostados, aunque en diferentes concentraciones. Tres de ellos: 1-hexanal (C2), 2-heptanona (C4) y 1-pentanol, aumentaron sus volúmenes con el proceso de tostado; mientras que se observó una disminución en la composición relativa de los otros nueve compuestos, de forma más significativa para las muestras R2. A parte del hexano (H2), el resto de compuestos volátiles cuyas señales se redujeron fueron prácticamente los mismos que en las matrices anteriores: 2-metil-1-butanol (A1), 3-metil-1-butanol (A2), 1-hexanol (A4), 2-etil-1-hexanol (A5), benzaldehído (B1), fenilacetaldehído (B2), alcohol bencílico (B6) y alcohol feniletílico (B7).

Se identificaron **dos compuestos volátiles** (3-heptanona (C5) y linalol (A6)) **de forma exclusiva en muestras de cacahuete crudo**; mientras que fueron **doce analitos** los que se detectaron **únicamente en muestras tostadas**. De todos ellos, nueve estaban presentes en todas las muestras tostadas R1 y R2, de los cuales cinco pertenecían al grupo de pirazinas (2-metilpirazina (P1), 2,5-dimetilpirazina (P3), 2,6-dimetilpirazina (P4), 2-etilpirazina (P5) y la pareja 2,3,5-trimetilpirazina y 2-etil-3-metilpirazina (P6+P7)), mientras que los demás eran: pentano (H1), 1-pentanal (C1), 1-heptanal (C3) y acetofenona (B3). Finalmente, los últimos tres volátiles: 2-pentilfurano (F4), 1-nonanal (C6) y trans-2-nonanal (C7), únicamente se identificaron en las muestras tostadas R2.

Pipa de girasol

Ambos tipos de muestras de pipas de girasol (crudas y tostadas) mostraron la presencia común de **diez compuestos volátiles** en diferentes porcentajes de volumen. En general, la concentración de cuatro analitos (pentano (H1), 1-pentanal (C1), 1-hexanal (C2) y 1-pentanol (A3)) aumentó en relación con el proceso de tostado, especialmente para los tres primeros. El resto de volátiles (hexano (H2), 1-hexanol (A4), 2-etil-1-hexanol (A5), γ -butirolactona (F2), fenilacetaldehído (B2) y alcohol bencílico (B6)) mostraron una disminución en su señal, más notable en las muestras tostadas R2, al igual que en el resto de matrices.

Además, la presencia de **tres compuestos volátiles** (2-metil-1-butanol (A1), benzaldehído (B1) y alcohol feniletílico (B7)) cuyas señales en el resto de frutos secos se vieron disminuidas con el tostado de las muestras, en este caso fue característica de las **muestras crudas**. Por otra parte, se detectaron **siete analitos exclusivamente en las muestras tostadas**. La mayoría de ellos fueron pirazinas: 2-metilpirazina (P1), 2,5-dimetilpirazina (P3), 2,6-dimetilpirazina (P4), 2,3,5-

trimetilpirazina y 2-etil-3-metilpirazina (P6+P7), además de 2-heptanona (C4) y 2-pentilfurano (F4). Únicamente el 1-nonanal (C6) fue detectado en las muestras tostadas en condiciones más intensas, R2.

7.8.2. CREACIÓN DE PLANTILLAS DE REFERENCIA PARA CADA MATRIZ

La información extraída de la caracterización de todas las muestras de frutos secos, fue utilizada para crear plantillas de cada una de las matrices, para proporcionar una visión global rápida y simple del perfil en 2D de la fracción volátil de cada fruto seco, que ayudase a caracterizar el tostado industrial aplicado a las muestras comerciales. Cada una de las plantillas se diseñó, *a posteriori*, de acuerdo al comportamiento de cada compuesto volátil en todas las muestras analizadas. A su vez, se convirtieron en un discriminador para medir el grado de similitud entre las muestras, al coincidir en mayor o menor medida con la plantilla de referencia de la matriz.

Las cuatro plantillas de matriz se muestran en la **Figura 41** y **Figura 42**. En todas ellas aparecen las tendencias de los diferentes grupos funcionales representadas mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles. En este caso, los colores de cada volátil marcan su comportamiento (presencia o ausencia) en la matriz:

- ◆ Blanco: analito común en la matriz, tanto cruda como tostada
- ◆ Blanco con asterisco: representa a un volátil presente exclusivamente en la matriz cruda
- ◆ Naranja: analito identificado en todas las muestras tostadas (R)
- ◆ Marrón: compuesto únicamente presente en las muestras tostadas R2
- ◆ Gris: volátil no detectado en el fruto seco.

Además, comparando los perfiles en 2D de la fracción volátil de los cuatro frutos secos se observó la presencia de ciertos analitos de forma exclusiva en una única matriz, por lo que también quedaron reflejadas estas peculiaridades en las plantillas de las matrices. Por tanto, se representaron dos casos particulares (**Figura 41** y **Figura 42**):

- ◆ Analito recuadrado en blanco: compuesto volátil cuya presencia fue exclusiva de una única matriz cruda
- ◆ Analito recuadrado en marrón: volátil cuya identificación fue exclusiva en una única matriz tostada.

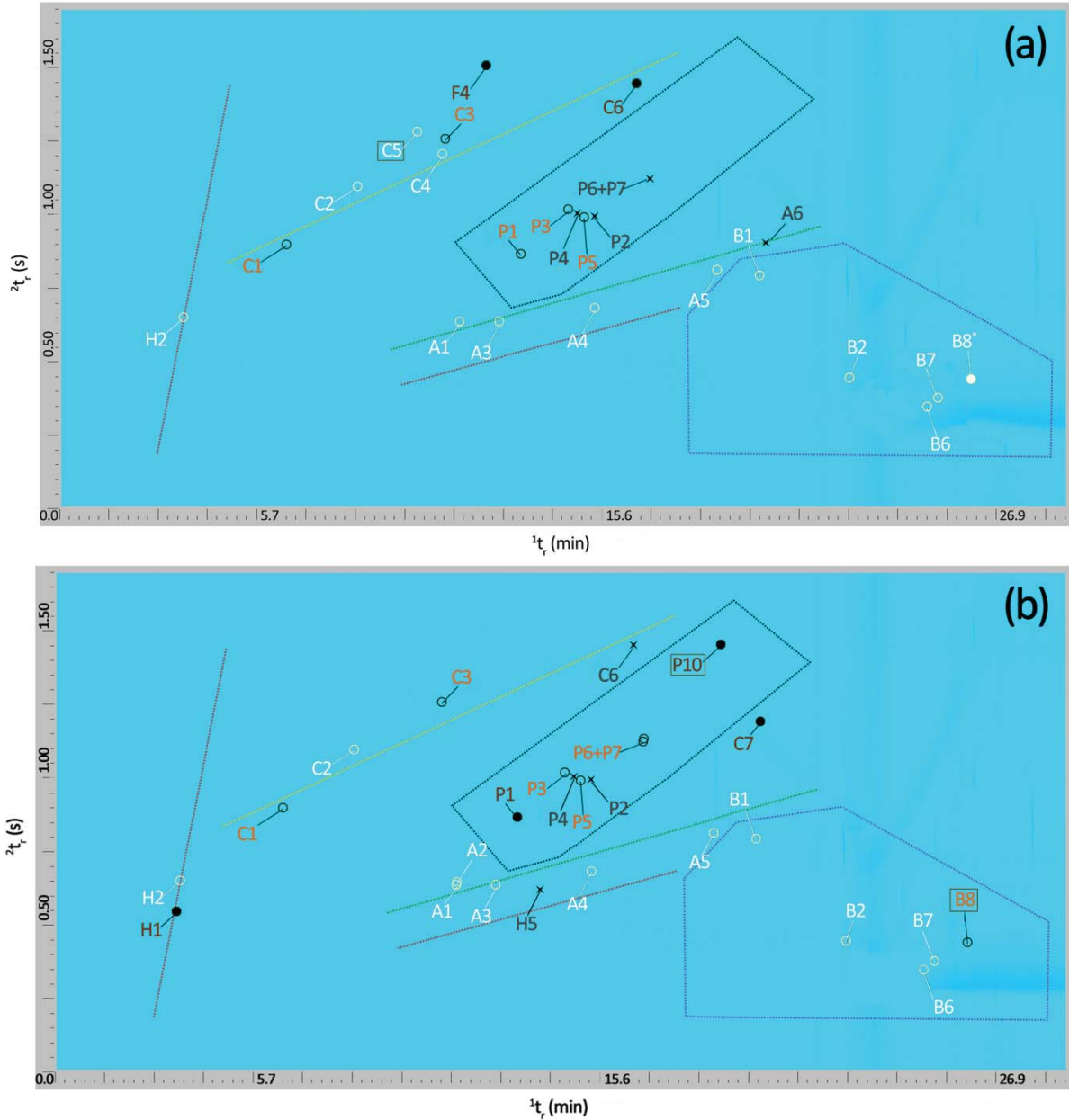


Figura 41. Plantillas de referencia de dos matrices individuales: (a) almendra y (b) avellana. Abreviaturas detalladas en la Tabla 38. Las tendencias de cada grupo funcional se representan mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles. Comportamiento del volátil simbolizado mediante un color: blanco (volátil común en la matriz), blanco con asterisco (exclusivo de la matriz cruda), naranja (característico en todas las muestras tostadas), marrón (presente únicamente en las muestras tostadas *R2*) y gris (volátil no detectado). Casos particulares de una matriz marcados a través de recuadros: en blanco (volátil exclusivo de una única matriz cruda) y en marrón (volátil exclusivo de una única matriz tostada).

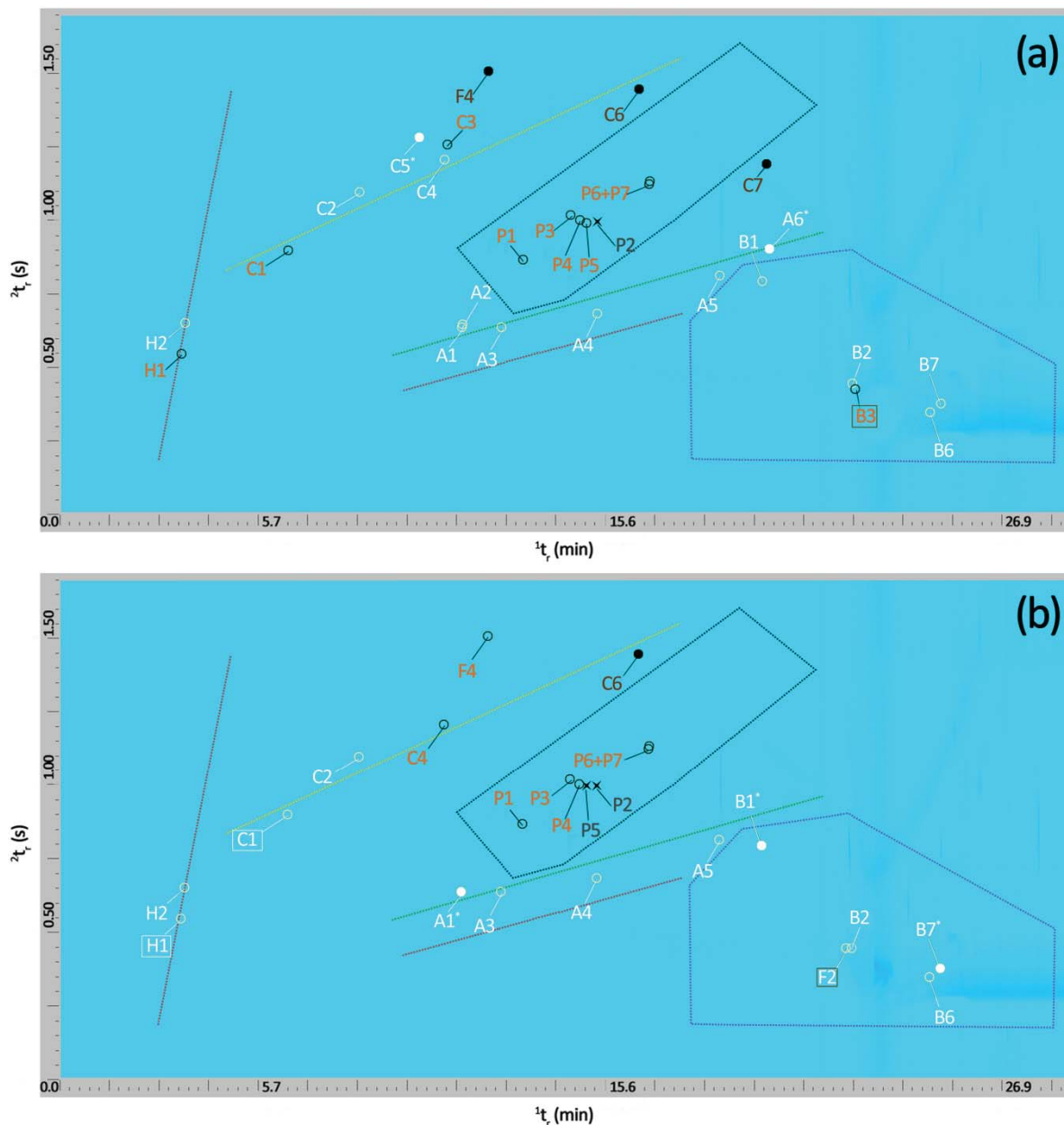


Figura 42. Plantillas de referencia de dos matrices individuales: (a) cacahuete y (b) pipa de girasol. Abreviaturas detalladas en la Tabla 38. Las tendencias de cada grupo funcional se representan mediante líneas (compuestas de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles. Comportamiento del volátil simbolizado mediante un color: blanco (volátil común en la matriz), blanco con asterisco (exclusivo de la matriz cruda), naranja (característico en todas las muestras tostadas), marrón (presente únicamente en las muestras tostadas *R2*) y gris (volátil no detectado). Casos particulares de una matriz marcados a través de recuadros: en blanco (volátil exclusivo de una única matriz cruda) y en marrón (volátil exclusivo de una única matriz tostada).

Por ejemplo, el volátil 3-heptanona (C5) era característico de las muestras de almendra tostada (**Figura 41a**), mientras que el 4-etilguaicol (B8) aparecía exclusivamente en muestras de avellana tostada (**Figura 41b**). Por otra parte, el 1-nonanal (C6) fue detectado en almendras, cacahuetes y pipas de girasol pero únicamente en las muestras comerciales R2 (**Figura 41a** y **Figura 42a, 42b**), y el alcohol feniletílico (B7), a pesar de encontrarse en almendras, avellanas y cacahuetes como analito común, se identificó solamente en las muestras de pipas de girasol crudas (**Figura 42b**).

Por todo ello, el objetivo de la creación de las plantillas de referencia de cada matriz fue su aplicación a muestras reales con el fin de confirmar el tipo de muestra analizada. A modo de ejemplo para demostrar su aplicabilidad, en la **Figura 43** aparecen representados los cromatogramas en 2D de tres muestras diferentes de pipas de girasol, cada una de ellas perteneciente a los tres grupos analizados: (a) cruda, (b) tostada R1 y (c) tostada R2; a los que se ha aplicado su propia plantilla de referencia (**Figura 41d**).

Se identificó claramente el perfil en 2D de la fracción volátil del cromatograma en 2D de la **Figura 43a** como muestra de pipa de girasol cruda, debido a la presencia de los trece volátiles que caracterizaban a este tipo de muestras (diez de ellos comunes y tres exclusivos de la matriz cruda), junto con la ausencia de los nueve analitos asociados al proceso de tostado.

Pero más relevante resultó la confirmación de muestras tostadas mediante plantillas de referencia de matriz, representadas en las **Figura 43b** y **Figura 43c**. Se comprobó que en ambas muestras de pipas de girasol tostadas se identificaron los diez analitos comunes a dicha matriz, además de los seis característicos de todas las muestras tostadas, considerados como marcadores potenciales del proceso de tostado de este fruto seco. Al mismo tiempo, se confirmó la ausencia de las dos pirazinas (P2 y P5), cuya presencia sería indicativa de un proceso de tostado en condiciones de t-T superiores a las industriales. Finalmente, la presencia de 1-nonanal (C6) en el perfil en 2D de la **Figura 43c**, pero no en la **Figura 43b**, únicamente sirvió para distinguir de forma rápida entre los dos tipos de tostado de las muestras, R2 y R1, respectivamente, no considerándose por tanto, marcador en potencia del proceso de tostado.

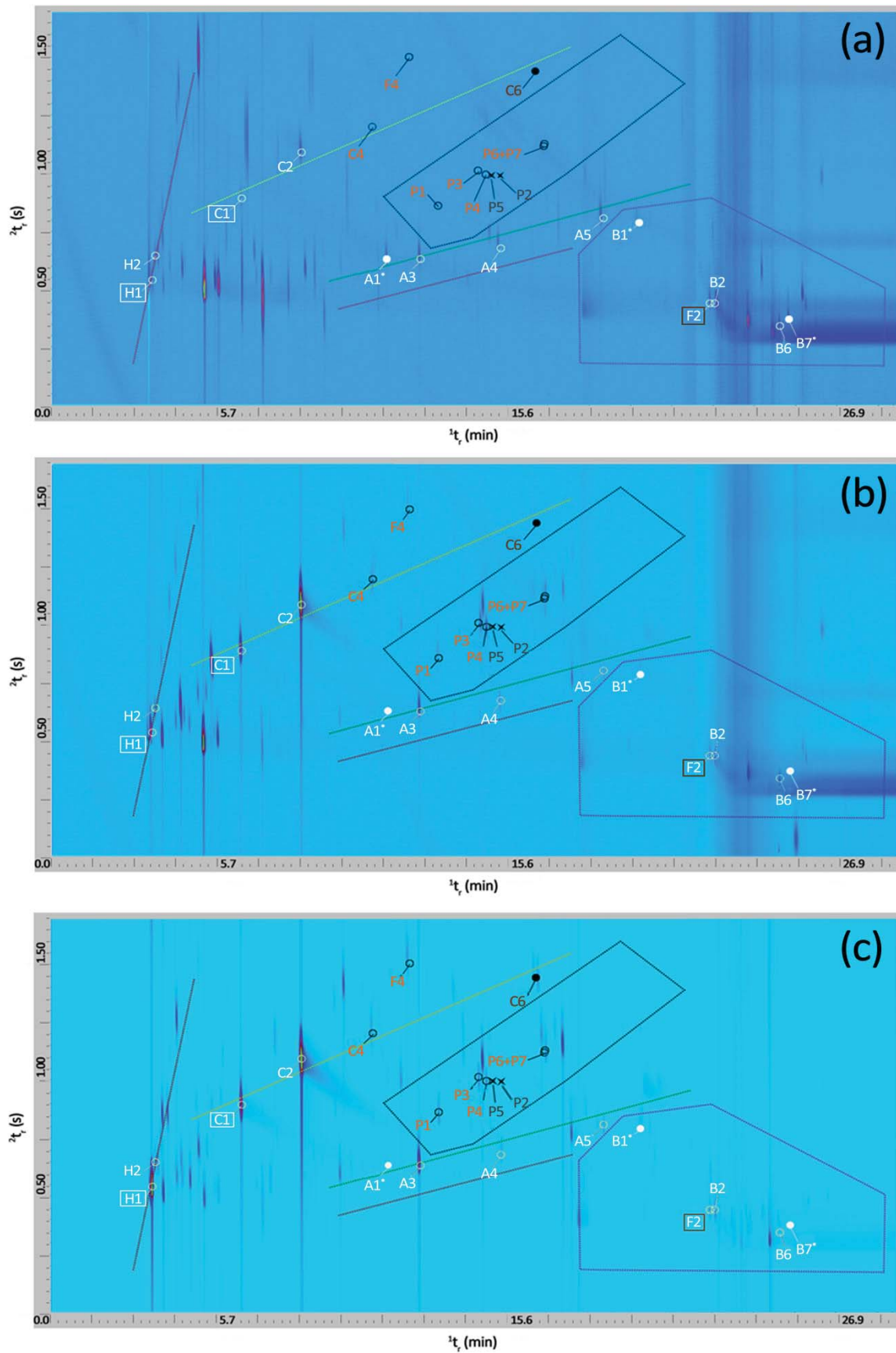


Figura 43. Aplicación de la plantilla de referencia de pipa de girasol a tres cromatogramas en 2D de diferentes muestras de pipas de girasol analizadas: (a) cruda, (b) tostada en condiciones suaves, *R1* y (c) tostada en condiciones más intensas *R2*.

7.9. CONSECUENCIAS

Se ha desarrollado un método para la separación e identificación de 43 compuestos volátiles, en menos de 30 min, mediante el acoplamiento HS-GC×GC-FID con un modulador de flujo capilar, para su aplicación a muestras comerciales de cuatro frutos secos.

La combinación de columnas que ha proporcionado mejores resultados, en términos de separación en ambas dimensiones (resoluciones y simetrías en 2D) y obteniendo la diferenciación más clara entre grupos funcionales, está compuesta por una primera columna de polietilenglicol, de polaridad alta (INNOWax) y una segunda columna de polaridad media (ZB-35), es decir una combinación de ortogonalidad inversa.

Se han optimizado, mediante diseños centrales compuestos, los parámetros cromatográficos de las separaciones GC×GC: flujos de ambas dimensiones y periodo de modulación.

El estudio del tostado a través de la comparación entre muestras comerciales y muestras sometidas a un tostado a escala de laboratorio, ha permitido considerar en cada una de las matrices ciertos compuestos volátiles como marcadores potenciales del tostado. A su vez, se han estimado de forma aproximada las condiciones de tostado industrial para cada una de las matrices, observándose que, en todas ellas, las muestras tostadas se agrupaban en dos conjuntos: *R1* y *R2*, dependiendo de si las condiciones de tostado eran más suaves o más intensas, respectivamente.

A partir del análisis semi-cuantitativo, se han determinado los cambios en los porcentajes de volumen de cada compuesto volátil, caracterizando las cuatro matrices en función de la composición de la fracción volátil de cada fruto seco crudo y tostado.

Finalmente, se han creado plantillas de referencia de cada matriz con el fin de proporcionar una visión global rápida y simple del perfil en 2D de la fracción volátil de cada fruto seco, que ayude a caracterizar el tostado industrial aplicado a cualquier muestra comercial.

7.10. BIBLIOGRAFÍA

- ⁸⁸ V. Vadivel, C.N. Kuyanga, H.K. Biesalski. *Health benefits of nut consumption with special reference to body weight control*. Nutrition, 28, (2012) 1089-1097.
- ⁸⁹ International Nut and Dried Fruit Council Foundation (INC). (01-04-2014). <http://www.nutfruit.org>
- ⁹⁰ M. Venkatachalam, S.K. Sathe. *Chemical composition of selected edible nut seeds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (2006) 4705-4714.
- ⁹¹ M.T.A.-E. Lois, C.R. García-Andrade, L.A.A.-S. Walther, J.M. Nuñez-Cortes. *The Mediterranean diet: a combination of beneficial elements for cardiovascular disease*. Current Nutrition & Food Science, 6 (2010) 105-108.
- ⁹² J. Aranceta, C. Pérez Rodrigo, A. Naska, V. Ruiz Vadillo, A. Trichopoulou. *Nut consumption in Spain and other countries*. British Journal of Nutrition, 96 (2006) S3-S11.
- ⁹³ I. Chetschik, M. Granvogl, P. Schieberle. *Comparison of the key aroma compounds in organically grown, raw west-African peanuts (Arachis hypogaea) and in ground, pan-roasted meal produced thereof*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (2008) 10237-10243.
- ⁹⁴ C. Alasalvar, E. Pelvan, B. Bahar, F. Korel, H. Ölmez. *Flavour of natural and roasted Turkish hazelnut varieties (Corylus avellana L.) by descriptive sensory analysis, electronic nose and chemometrics*. International Journal of Food Science and Technology, 47 (2012) 122-131.
- ⁹⁵ L. Nicolotti, C. Cordero, C. Bicchi, P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto. *Volatile profiling of high quality hazelnuts (Corylus avellana L.): Chemical indices of roasting*. Food Chemistry, 138 (2013) 1723-1733.
- ⁹⁶ G.L. Baker, J.A. Cornell, D.W. Gorbet, S.F. O'Keefe, C.A. Sims, S.T. Talcott. *Determination of pyrazine and flavor variations in peanut genotypes during roasting*. Journal of Food Science, 68 (2003) 394-400.
- ⁹⁷ J.P. Williams, S.E. Duncan, R.C. Williams, K. Mallikarjunan, W.N. Eigel III, S.F. O'Keefe. *Flavor-fade in peanuts during short-term storage*. Journal of Food Science, 71 (2006) S265-S269.
- ⁹⁸ C. Cordero, C. Bicchi, P. Rubiolo. *Group-type and fingerprint analysis of roasted food matrices (coffee and hazelnut samples) by comprehensive two-dimensional gas chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (2008) 7655-7666.
- ⁹⁹ P. Manzano, J.C. Diego, J.L. Bernal, M.J. Nozal, J. Bernal. *Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with static headspace sampler to analyze volatile compounds. Application to almonds*. Journal of Separation Science, 37 (2014) 675-683.

- 100** L. Vázquez-Araújo, L. Enguix, A. Verdú, E. García-García, A.A. Carbonell-Barrachina. *Investigation of aromatic compounds in toasted almonds used for the manufacture of turrón*. European Food Research and Technology, 227 (2008) 243-254.
- 101** L. Vázquez-Araújo, A. Verdú, A.A. Carbonell-Barrachina. *Aroma volatiles of 'a la Piedra' Turrón*. Flavour and Fragrance Journal, 23 (2008) 84-92.
- 102** A. Burdack-Freitag, P. Schieberle. *Characterization of the key odorants in raw Italian hazelnuts (Corylus avellana L. var. Tonda Romana) and roasted hazelnut paste by means of molecular sensory science*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (2012) 5057-5064.
- 103** M. Hojjati, A. Calín-Sánchez, S. Hadi Razavi, A.A. Carbonell-Barrachina. *Effect of roasting on colour and volatile composition of pistachios (Pistacia vera L.)*. International Journal of Food Science and Technology, 48 (2013) 437-443.
- 104** J. Kiefl, P. Schieberle. *Evaluation of process parameters governing the aroma generation in three hazelnut cultivars (Corylus avellana L.) by correlating quantitative key odorant profiling with sensory evaluation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (2013) 5236-5244.
- 105** L. Vázquez-Araújo, A. Verdú, P. Navarro, F. Martínez-Sánchez, A. A. Carbonell-Barrachina. *Changes in volatile compounds and sensory quality during toasting of Spanish almonds*. International Journal of Food Science and Technology, 44 (2009) 2225-2233.
- 106** C. Cordero, E. Liberto, C. Bicchi, P. Rubiolo, P. Schieberle, S.E. Reichenbach, Q. Tao. *Profiling food volatiles by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with mass spectrometry: Advanced fingerprinting approaches for comparative analysis of the volatile fraction of roasted hazelnuts (Corylus avellana L.) from different origins*. Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 5848-5858.
- 107** A. Burdack-Freitag, P. Schieberle. *Changes in the key odorants of Italian hazelnuts (Corylus avellana L. Var. Tonda Romana) induced by roasting*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010) 6351-6359.
- 108** J. Kiefl, G. Pollner, P. Schieberle. *Sensomics analysis of key hazelnut odorants (Corylus avellana L. 'Tonda Gentile') using comprehensive two-dimensional gas chromatography in combination with time-of-flight mass spectrometry (GC×GC-TOF-MS)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (2013) 5226-5235.
- 109** O. Lasekan, K. Abbas. *Analysis of volatile flavour compounds and acrylamide in roasted Malaysian tropical almond (Terminalia catappa) nuts using supercritical fluid extraction*. Food and Chemical Toxicology, 48 (2010) 2212-2216.
- 110** J. Kiefl, C. Cordero, L. Nicolotti, P. Schieberle, S.E. Reichenbach, C. Bicchi. *Performance evaluation of non-targeted peak-based cross-sample analysis for comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry data and application to processed hazelnut profiling*. Journal of Chromatography A, 1243 (2012) 81-90.

- 111** J.I. Maté, M.E. Saltveit, J.M. Krochta. *Peanut and walnut rancidity: effects of oxygen concentration and relative humidity*. Journal of Food Science, 61 (**1996**) 465-469.
- 112** S.Y. Lee, J.M. Krochta. *Accelerated shelf life testing of whey-protein-coated peanuts analyzed by static headspace gas chromatography*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (**2002**) 2022-2028.
- 113** G. Procida, B. Stancher, F. Cateni, M. Zacchigna. *Chemical composition and functional characterisation of commercial pumpkin seed oil*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93 (**2013**) 1035-1041.
- 114** L. Aceña, L. Vera, J. Guasch, O. Busto, M. Mestres. *Determination of roasted pistachio (*Pistacia vera* L.) key odorants by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-Olfactometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (**2011**) 2518-2523.
- 115** B. d'Acampora Zellner, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. *Gas chromatography– olfactometry in food flavour analysis*. Journal of Chromatography A, 1186 (**2008**) 123-143.
- 116** S. Sahin, Ö. Aybastier, E. Isik. *Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology*. Food Chemistry, 141 (**2013**) 1361-1368.

CONCLUSIONES

1. Se ha puesto de manifiesto la complementariedad de las modalidades mono y bidimensionales de la cromatografía en fase gaseosa para el análisis pormenorizado de ácidos grasos y compuestos volátiles en aperitivos o snacks.
2. El empleo de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha facilitado la separación y cuantificación de compuestos volátiles en muestras de vino y ácidos grasos en muestras de patatas fritas.

Mediante análisis de varianza se ha demostrado que el sistema de envejecimiento y la variedad de cultivo de patata utilizada causaban mayores diferencias significativas, concretamente en 17 compuestos volátiles y 11 ácidos grasos, respectivamente. En cuanto al análisis en componentes principales, se encontraron diferencias entre grupos de muestras similares desde el punto de vista de su fracción volátil o su perfil de ácidos grasos, explicadas con un 85.5-86.0 % de la variabilidad total de los datos.

3. El empleo de la cromatografía bidimensional acoplada a detector de ionización de llama con un modulador de flujo capilar ha permitido, desde otra perspectiva, la separación e identificación también de ácidos grasos y compuestos volátiles.

La principal ventaja de la técnica bidimensional sobre la monodimensional ha sido la separación e identificación de dos grupos de isómeros de ácidos grasos esenciales pertenecientes a la familia C18: ácidos linoléico y linolénico.

La elección de la mejor combinación de columnas para llevar a cabo la separación en 2D, junto con la optimización de los cuatro parámetros más influyentes en la cromatografía bidimensional, se ha visto favorecida con la aplicación de un diseño de experimentos, consiguiendo realizar una experimentación de forma más eficaz obteniéndose los resultados con un menor coste de tiempo y material.

Las combinaciones de columnas de ortogonalidad inversa han proporcionado mejores separaciones en 2D, concretamente utilizando combinaciones: polar alta × polar media.

4. Los tratamientos de muestra se han adecuado al tipo de matriz considerada. Se ha empleado la extracción sólido-líquido tradicional, Soxhlet, y la extracción con fluidos supercríticos, seguidas de una etapa de derivatización, para la extracción y análisis de los ácidos grasos. En cambio, para la determinación de compuestos volátiles, se han empleado la extracción en fase sólida en los vinos y una extracción directa y automatizada mediante headspace estático en los frutos secos, la cual ha resultado idónea por su sencillez y por obtener la fracción volátil de frutos secos a niveles organolépticos, de la forma más similar al sistema olfativo humano.

5. La identificación de compuestos mediante cromatografía bidimensional se ha realizado de forma rápida y sencilla a través de plantillas de referencia, cuya superficie en 2D es capaz de representar las posiciones de los analitos mediante sus dos tiempos de retención, es decir, representar la “huella dactilar” de la propia muestra, en función de los analitos separados.

La gran utilidad de las plantillas en la cromatografía bidimensional se ha puesto de manifiesto en primer lugar, al identificar y diferenciar los analitos por familias o grupos funcionales en los cromatogramas en 2D. En el caso de los ácidos grasos, se han hecho visibles las diferentes tendencias entre ácidos grasos saturados, insaturados con distinto número de saturaciones o distinta posición de las mismas. Por otra parte, en los compuestos volátiles se han diferenciado perfectamente las zonas de grupos funcionales, por ejemplo, los heterociclos aromáticos como pirazinas o compuestos bencénicos.

En segundo lugar, la utilidad de las plantillas se ha demostrado en el estudio de la fracción volátil de diversos frutos secos, al emplearlas globalmente para ver el grado de similitud o concordancia del cromatograma en 2D completo de una muestra con otras analizadas bajo las mismas condiciones cromatográficas.

APÉNDICE

APÉNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO IV	Pág.
Tabla 1. Compuestos volátiles estudiados en la fracción volátil del vino.	25
Tabla 2. Lista de analitos estudiados con sus respectivos tiempos de retención (t_r), iones mayoritarios (T) e iones de confirmación (Q_1 , Q_2) con sus porcentajes de abundancia (% Q_1 , % Q_2).	30
Tabla 3. Factores considerados en el cribado e intervalos de experimentación.	33
Tabla 4. Matriz de experiencias en un diseño factorial fraccional con 6 factores.	34
Tabla 5. Matriz de 30 experiencias para un diseño central compuesto con 3 factores y 3 puntos centrales.	36
Tabla 6. Tabla del ANOVA del ajuste llevado a cabo para el 4-etilguayacol.	38
Tabla 7. Intervalo ensayado y condiciones óptimas de trabajo para la extracción en fase sólida de compuestos volátiles en vino en cartuchos Strata-X.	40
Tabla 8. Intervalos de calibración, parámetros de la regresión, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada analito en la matriz en la cual se realizó la calibración.	43
Tabla 9. Valores para la evaluación de la exactitud y la precisión del método a dos niveles de concentración (0.01 y 0.1 mg/L).	45
Tabla 10. Lista de muestras de vinos Ribera de Duero, especificando el sistema de envejecimiento utilizado y el origen de la madera de roble utilizada para ello.	47
Tabla 11. Medidas estadísticas descriptivas del contenido de fracción volátil en vinos con astillas, barricas y tablonas como sistemas utilizados para el envejecimiento del vino.	49
Tabla 12. Significación (p-valor) para cada variable estudiada en función del sistema de envejecimiento, el origen de la madera y la interacción entre ambos factores.	51
Tabla 13. Varianza total explicada y autovalores en el análisis de componentes principales.	53
Tabla 14. Pesos de los compuestos estudiados en las ocho primeras componentes.	55
Tabla 15. Coeficientes estandarizados de las funciones canónicas en la discriminación entre el sistema de envejecimiento.	61
Tabla 16. Porcentajes de muestras correctamente clasificadas tanto en clasificación directa como en validación cruzada.	63
Tabla 17. Probabilidades de que un vino clasificado en un sistema de envejecimiento pertenezca realmente a dicho sistema.	63
Tabla 18. Coeficientes estandarizados de la función canónica en la discriminación entre sistemas de envejecimiento mediante astillas y tablonas+barrica.	64
Tabla 19. Resultados de la discriminación entre vinos envejecidos con astillas frente a vinos envejecidos con barricas o mediante tablonas.	65
Tabla 20. Coeficientes estandarizados de la función canónica en la discriminación entre sistemas de envejecimiento mediante tablonas y en barrica.	66
Tabla 21. Resultados de la clasificación directa y mediante validación cruzada en la discriminación entre vinos envejecidos en barrica y mediante tablonas.	66

Tabla 22. Probabilidades de que un vino clasificado en un sistema de envejecimiento pertenezca realmente a dicho sistema.	67
--	----

CAPÍTULO V

Tabla 23. Lista de FAME ordenados según el número creciente de átomos de carbono e insaturaciones.	79
Tabla 24. Lista de FAME identificados numerados por orden de elución, con sus tiempos de retención (t_r), ión mayoritario (T) e iones de confirmación (Q_1 , Q_2) y sus respectivas abundancias relativas (% Q_1 , % Q_2).	83
Tabla 25. Procedimientos de extracción de ácidos grasos evaluados, con sus respectivas referencias bibliográficas (^{12,21,22}), tiempos relativos de extracción con el disolvente extractante utilizado y las etapas principales.	86
Tabla 26. Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar relativas (% RSD) (n=5) obtenidos al aplicar los cuatro procedimientos de extracción de ácidos grasos ensayados a dos niveles de concentración, 5g/100g y 30g/100g para aquellos FAME mayoritarios en las muestras; y 0.2mg/100g y 100mg/100g para los FAME minoritarios.	87
Tabla 27. Parámetros de la regresión (pendiente y R^2), límites de detección (LOD), cuantificación (LOQ) y repetibilidad de los 36 FAME estudiados (n=5) para la variedad de patata frita <i>Mustang</i> con aceite 1.	94
Tabla 28. Comparación de concentraciones e intervalos de confianza (IC), de 4 FAME, entre los métodos de patrón externo y adiciones patrón, para la variedad de patata <i>Hermes</i> con aceite 2.	96
Tabla 29. Concentraciones medias e intervalos de confianza (IC; $\alpha=0.05$) de los 36 ácidos grasos para las muestras de patatas fritas agrupadas en función de la variedad de patata y el aceite utilizado (H: <i>Hermes</i> ; M: <i>Mustang</i> ; 1: aceite vegetal 1; 2: aceite vegetal 2).	97
Tabla 30. Concentraciones y porcentajes de masa medios de los diferentes grupos de ácidos grasos más relevantes en la nutrición humana, en las variedades de patatas fritas estudiadas. (H: <i>Hermes</i> ; M: <i>Mustang</i> ; 1: aceite vegetal 1; 2: aceite vegetal 2).	98
Tabla 31. Efectos significativos (*) (p-valor < 0.05) de las variables estudiadas en función de la variedad de patata, el aceite vegetal de fritura y la interacción entre ambos factores.	100
Tabla 32. Autovalores iniciales y varianza total explicada en un análisis de componentes principales con rotación varimax.	101

CAPÍTULO VI

Tabla 33. Lista de los isómeros de la familia C18 estudiados, ordenados según el número creciente de átomos de carbono e insaturaciones.	117
Tabla 34. Combinaciones de columnas utilizadas en el estudio de la separación de compuestos e isómeros de FAME.	121

Tabla 35. Valores óptimos de los parámetros más influyentes en GC×GC para las 7 combinaciones de columnas estudiadas.	123
Tabla 36. Lista de FAME identificados dispuestos por orden de elución en la primera dimensión, con sus tiempos de retención en la primera (1t_r) y segunda (2t_r) dimensión.	134
Tabla 37. FAME identificados en cada una de las tres variedades de hojas de brócoli (n=6): <i>Naxos</i> , <i>Nubia</i> y <i>Viola</i> .	140

CAPÍTULO VII

Tabla 38. Lista de los 43 compuestos volátiles estudiados con las abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).	151
Tabla 39. Combinaciones de columnas utilizadas en el estudio de la separación en 2D de compuestos volátiles.	159
Tabla 40. Matriz de 16 experiencias para un diseño central compuesto con 3 factores y 2 puntos centrales.	159
Tabla 41. Tabla del ANOVA del ajuste llevado a cabo para la simetría en 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el <i>Set 1</i> .	163
Tabla 42. Valores óptimos de los parámetros más influyentes en GC×GC para las 5 combinaciones de columnas estudiadas.	167
Tabla 43. Lista de los 43 compuestos volátiles clasificados por orden de elución en la primera dimensión, con sus abreviaturas y sus tiempos de retención en la primera (1t_r) y segunda (2t_r) dimensión.	175
Tabla 44. Estudio del comportamiento (presencia/ausencia) de los compuestos volátiles en las muestras de almendras crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio y estimación de las condiciones de t-T de las muestras tostadas comerciales.	180
Tabla 45. Estudio del comportamiento (presencia/ausencia) de los compuestos volátiles en las muestras de avellanas crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio y estimación de las condiciones de t-T de las muestras tostadas comerciales.	180
Tabla 46. Estudio del comportamiento (presencia/ausencia) de los compuestos volátiles en las muestras de cacahuets crudos sometidos a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio y estimación de las condiciones de t-T de las muestras tostadas comerciales.	181
Tabla 47. Estudio del comportamiento (presencia/ausencia) de los compuestos volátiles en las muestras de pipas de girasol crudas sometidas a diferentes condiciones de t-T de tostado a escala de laboratorio y estimación de las condiciones de t-T de las muestras tostadas comerciales.	181
Tabla 48. Condiciones estimadas de tostado en las muestras tostadas comerciales.	182
Tabla 49. Compuestos volátiles dependientes del proceso de tostado, caracterizados por su presencia (R , R_2) o a ausencia ($(t-T) < R$, $(t-T) > R_2$) en las muestras tostadas comerciales.	183

Tabla 50. Composiciones relativas (% V) y desviaciones estándar relativas (% RSD) (n=3) 185
de los compuestos volátiles identificados en cada una de las muestras
comerciales analizadas: crudas, tostadas en condiciones suaves (R1) y tostadas
en condiciones más intensas (R2).

APÉNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO III	Pág.
Figura 1. Cromatógrafo de gases acoplado a detector de espectrometría de masas (GC-MS).	11
Figura 2. Cromatógrafo de gases bidimensional acoplado a detector de ionización de llama (GCxGC-FID).	12
Figura 3. Interior del horno cromatográfico y colocación de las dos columnas cromatográficas con el modulador de flujo capilar. Ampliación del modulador señalando la entrada desde la primera columna (azul) y la salida del mismo hacia la segunda columna (rojo).	13
Figura 4. Acoplamiento del headspace estático al cromatógrafo de gases bidimensional con detector de ionización de llama (HS-GCxGC-FID).	15
CAPÍTULO IV	
Figura 5. Cromatograma en modo SIM de una mezcla de patrones de los 40 compuestos volátiles en diclorometano en una concentración de 10 mg/L y 2-octanol como patrón interno (pl).	31
Figura 6. Esquema del tratamiento de muestra por extracción en fase sólida. Marcados en rojo los factores a estudiar mediante un diseño de cribado.	33
Figura 7. Diagramas de pareto para dos compuestos volátiles: (a) 2-furilmetil cetona y (b) 4-etilguayacol.	35
Figura 8. Diagrama de pareto para el analito 4-etilguayacol.	37
Figura 9. Gráfico de efectos principales para la guayacilacetona.	39
Figura 10. Superficie de respuesta para la función de deseabilidad estimada, en función de dos de los factores y fijando el valor del tercero: $V_{muestra}=10.0$ mL. Marcado el área y el valor de mayor deseabilidad.	40
Figura 11. Esquema del método propuesto para el tratamiento de muestra por extracción en fase sólida. Marcados en rojo los valores óptimos de los factores más influyentes sometidos a estudio.	41
Figura 12. Cromatogramas de muestras de vino envejecidas en (a) barrica y (b) mediante un sistema acelerado con tablonés.	48
Figura 13. Box-plot correspondiente al perfil de la concentración de 1-hexanal en función del sistema de envejecimiento del vino.	52
Figura 14. Diagrama de dispersión de las puntuaciones factoriales de los vinos, diferenciadas por su sistema de envejecimiento, en el plano de las componentes 1 y 2.	56
Figura 15. Diagrama de dispersión de las puntuaciones de los vinos, diferenciadas por la naturaleza de la madera utilizada para el envejecimiento de los vinos, en el plano de las componentes 1 y 2.	58
Figura 16. Diagrama de dispersión de las puntuaciones factoriales de los vinos, diferenciadas por su sistema de envejecimiento, en el plano de las componentes 3 y 4.	58

Figura 17. Dendrograma de conglomerados de distancia re-escalados.	60
Figura 18. Puntuaciones discriminantes obtenidas para las dos primeras funciones canónicas, en función del sistema de envejecimiento.	62

CAPÍTULO V

Figura 19. Cromatograma en modo SIM de una disolución de patrones de los 36 FAME en diclorometano. Los números corresponden a los FAME enumerados en la Tabla 2, cuyas concentraciones fueron de 10 mg/L (FAME: 4, 6, 8-10, 12-14, 16, 18-21, 23-29, 31-34, 36), 20 mg/L (FAME: 1-3, 5, 7, 15, 17, 22, 30, 35) y 30 mg/L (FAME: 11).	84
Figura 20. Esquema del método propuesto para el tratamiento de muestra formado por dos etapas: extracción de ácidos grasos de la muestra y derivatización a ésteres metílicos.	90
Figura 21. Cromatograma de una muestra de patata frita <i>Hermes</i> con aceite 2. Los FAME mayoritarios están identificados en el cromatograma superior (muestra sometida a dilución 1:400) y los minoritarios en la ampliación del propio cromatograma (muestra con dilución 1:4). Los números corresponden a los FAME según la Tabla 2.	91
Figura 22. Gráfica de comparación de pendientes de las líneas de calibrado mediante adiciones patrón y por patrón externo, para el C18:2(n6) en la muestra de patata frita <i>Mustang</i> con aceite vegetal 1.	93
Figura 23. Pesos de las 36 variables en la representación de las (a) dos primeras componentes principales y (b) en la tercera y cuarta componentes.	103
Figura 24. Puntuaciones para las muestras de patatas fritas en las componentes (a) primera y segunda y (b) tercera y cuarta; etiquetadas según la variedad de patata y el aceite vegetal utilizado en su fritura.	105

CAPÍTULO VI

Figura 25. Esquema del equipo de extracción con fluidos supercríticos.	118
Figura 26. Cromatogramas en 3D de la mezcla de patrones S37 analizada empleando las condiciones finales de las 3 combinaciones de columnas: (a) <i>Set 1</i> , (b) <i>Set 3</i> y (c) <i>Set 6</i> .	125
Figura 27. Ampliaciones de las zonas de elución en los cromatogramas en 3D de las mezclas de isómeros de ácidos linoléico y linolénico, analizados de forma individual empleando las condiciones finales de las 3 combinaciones de columnas: <i>Set 1</i> , (a) y (d); <i>Set 3</i> , (b) y (e); <i>Set 6</i> , (c) y (f), respectivamente.	127
Figura 28. Cromatograma en 3D de los FAME analizados empleando las condiciones finales del <i>Set 2</i> .	129
Figura 29. Ampliación de la zona de elución de la familia C18 en el cromatograma en 3D (Figura 4), empleando las condiciones finales del <i>Set 2</i> .	130
Figura 30. Cromatograma en 3D de los FAME analizados empleando las condiciones finales del <i>Set 6</i> .	131

Figura 31. Ampliación de la zona de elución de la familia C18 en el cromatograma en 3D (Figura 6), empleando las condiciones finales del <i>Set 2</i> .	132
Figura 32. Plantilla de identificación en 2D de 47 FAME analizados mediante el método cromatográfico establecido para el <i>Set 6</i> .	137
Figura 33. Cromatograma en 2D de una muestra de hojas de brócoli de la variedad <i>Nubia</i> , donde se han identificado 32 FAME a partir de la plantilla de referencia.	139
CAPÍTULO VII	
Figura 34. Diagramas de pareto estandarizados para (a) simetría 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el <i>Set 1</i> ; (b) 1t_r del 1-pentanal en el <i>Set 3</i> ; (c) resolución 2D de la 2,3,5,6-tetrametilpirazina en el <i>Set 4</i> ; y (d) altura 3D del 1-hexanol en el <i>Set 5</i> . Las líneas rojas verticales indican los efectos significativos de primer y segundo orden y las interacciones para los factores: A: flujo de gas portador de la 1D ; B: flujo de gas portador de la 2D ; y C: periodo de modulación (PM).	161
Figura 35. Superficies de respuesta estimadas para (a) simetría 2D de la 2,3-dimetilpirazina en el <i>Set 1</i> ; (b) 1t_r del 1-pentanal en el <i>Set 3</i> ; (c) resolución 2D de la 2,3,5,6-tetrametilpirazina en el <i>Set 4</i> ; y (d) altura 3D del 1-hexanol en el <i>Set 5</i> . Las superficies de respuesta se representan en 3D, en los intervalos estudiados de dos de los factores, manteniendo el valor del tercer factor constante. Factores: flujos de la primera y segunda dimensión (flujos 1D y 2D) y periodo de modulación (PM).	164
Figura 36. Superficie de respuesta para la función de deseabilidad estimada para el <i>Set 4</i> , en función de los factores: flujo de gas portador de la 1D y de la 2D , y fijando un valor de 1.70 s para el tercero: periodo de modulación (PM). Aparece marcado el área y el valor de mayor deseabilidad.	166
Figura 37. Cromatogramas en 3D de la mezcla de patrones de compuestos volátiles analizados empleando las condiciones finales de las 3 combinaciones de columnas: (a) <i>Set 1</i> , (b) <i>Set 3</i> y (c) <i>Set 5</i> . Compuestos volátiles diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F).	169
Figura 38. Cromatogramas en 2D de la mezcla de patrones de compuestos volátiles analizados empleando las condiciones finales de los 2 sets de columnas de ortogonalidad inversa con la primera dimensión cianopropil: (a) <i>Set 2</i> , (b) <i>Set 3</i> . Compuestos volátiles diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F). La tendencia de cada grupo funcional se representa mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles.	171
Figura 39. Cromatogramas en 2D de la mezcla de patrones de compuestos volátiles analizados empleando las condiciones finales de los 2 sets de columnas de ortogonalidad inversa con la primera dimensión polietilenglicol: (a) <i>Set 4</i> , (b) <i>Set 5</i> . Compuestos volátiles diferenciados por colores y abreviaturas	172

correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F). La tendencia de cada grupo funcional se representa mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles.

- Figura 40.** Plantilla de identificación en 2D de los 43 compuestos volátiles analizados mediante el método cromatográfico establecido para el Set 4. Aparecen diferenciados por colores y abreviaturas correspondientes a cada grupo funcional: hidrocarburos (H), carbonilos (C), pirazinas (P), alcoholes (A), derivados bencénicos (B) y furánicos (F). La tendencia de cada grupo funcional se representa mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles. 178
- Figura 41.** Plantillas de referencia de dos matrices individuales: (a) almendra y (b) avellana. Abreviaturas detalladas en la Tabla 38. Las tendencias de cada grupo funcional se representan mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles. Comportamiento del volátil simbolizado mediante un color: blanco (volátil común en la matriz), blanco con asterisco (exclusivo de la matriz cruda), naranja (característico en todas las muestras tostadas), marrón (presente únicamente en las muestras tostadas R2) y gris (volátil no detectado). Casos particulares de una matriz marcados a través de recuadros: en blanco (volátil exclusivo de una única matriz cruda) y en marrón (volátil exclusivo de una única matriz tostada). 189
- Figura 42.** Plantillas de referencia de dos matrices individuales: (a) cacahuete y (b) pipa de girasol. Abreviaturas detalladas en la Tabla 38. Las tendencias de cada grupo funcional se representan mediante líneas (compuestos de cadena lineal) o regiones (heterociclos aromáticos) del mismo color que el grupo al que pertenecen los compuestos volátiles. Comportamiento del volátil simbolizado mediante un color: blanco (volátil común en la matriz), blanco con asterisco (exclusivo de la matriz cruda), naranja (característico en todas las muestras tostadas), marrón (presente únicamente en las muestras tostadas R2) y gris (volátil no detectado). Casos particulares de una matriz marcados a través de recuadros: en blanco (volátil exclusivo de una única matriz cruda) y en marrón (volátil exclusivo de una única matriz tostada). 190
- Figura 43.** Aplicación de la plantilla de referencia de pipa de girasol a tres cromatogramas en 2D de diferentes muestras de pipas de girasol analizadas: (a) cruda, (b) tostada en condiciones suaves, R1 y (c) tostada en condiciones más intensas R2. 192