

**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**CIENCIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**



**CONSTITUYENTES AROMÁTICOS DEL ZUMO DE  
NARANJA. EFECTO DEL PROCESADO INDUSTRIAL**

Memoria presentada por D<sup>a</sup>. MARÍA JOSÉ JORDÁN BUESO, para  
optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

**MURCIA, JUNIO 1999**



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
Departamento de Anatomía,  
Anatomía Patológica Comparadas  
y Tecnología de los Alimentos

**JOSÉ LAENCINA SÁNCHEZ, CATEDRÁTICO DE TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA.**

**INFORMA:**

Que D<sup>a</sup>. MARÍA JOSÉ JORDÁN BUESO, Licenciada en Ciencias Químicas ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo sobre **“CONSTITUYENTES AROMÁTICOS DEL ZUMO DE NARANJA. EFECTO DEL PROCESADO INDUSTRIAL”**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica deseadas para su defensa por parte de la interesada, con vistas a optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, lo firmo autorizando su presentación.

Murcia, Junio 1999



UNIVERSIDAD DE MURCIA  
Departamento de Anatomía,  
Anatomía Patológica Comparadas  
y Tecnología de los Alimentos

**D. ANTONIO BERNABÉ SALAZAR, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA, ANATOMIA PATOLÓGICA COMPARADAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**INFORMA:**

Que en Junta de Departamento se acordó por unanimidad la tramitación de la Tesis Doctoral titulada “Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. Efecto del procesado industrial”, presentada por la Licenciada en Ciencias Químicas D<sup>a</sup> María José Jordán Bueso.

Lo que se hace constar a efectos oportunos, en Murcia y Junio de 1999.

**ILMO. SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO DEL GRUPO ÁREAS DE CIENCIAS DE LA SALUD**

***A quienes han hecho posible alcanzar  
este punto del camino, mis padres***

***A Jesús***

## **AGRADECIMIENTOS**

- *Al Prof. D. José Laencina Sánchez, por confiar en mis posibilidades y brindarme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral, bajo su dirección. Gracias por su apoyo y orientación en lo que es hoy mi vocación profesional.*

- *A Barbara Mucci, por su ayuda, apoyo y amistad, especialmente, por los momentos compartidos delante del cromatógrafo de gases.*

- *A todos mis compañeros de la U.D. de Tecnología de Alimentos, especialmente a, Queru, Mavi, Pilar, Manuel, José María, Mariola, Belén, José María, M<sup>a</sup> Dolores, Sancho y Antonio, por su apoyo incondicional.*

- *A Carlos de Jodar, por su inestimable ayuda en el campo informático*

- *A la empresa Rivervend España por facilitarme las muestras de zumo de naranja analizadas y en especial a M<sup>a</sup> Paz y Nieves, por su disponibilidad y predisposición en todo momento.*

- *Al personal del Servicio de Instrumentación Científica de la Facultad de Veterinaria, en especial a M<sup>a</sup> Dolores Alcázar, José Rodríguez e Isabel Buendía, por sus consejos y amistad.*

- *A la Comunidad Económica Europea, que a través del proyecto AIR me ha sido concedida una beca de investigación bajo la cual se ha realizado esta Tesis Doctoral.*

## ABREVIATURAS

---

atm	atmósfera física
GC	Cromatografía gaseosa
FID	Detector de ionización de llama
HS	Espacio de cabeza
min.	Minutos
MS	Espectrometría de masas
mV	miliVoltios
N.D.	No detectado
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilxilosano
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por trillón
p.eb.	Punto de ebullición
SDE	Destilación-Extracción simultánea
SPME	Microextracción en fase sólida
tr	Trazas

---

**INDICE**

<b>OBJETO</b>	<b>1</b>
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>I.1.- PRODUCCIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN DE LA NARANJA           EN LA REGIÓN DE MURCIA</b>	<b>11</b>
<b>I.2.- TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DE LA NARANJA</b>	<b>15</b>
<b>I.2.1.- Naranja. Materia prima para la industria cítrica</b>	<b>17</b>
<b>I.2.2.- Elaboración de zumos cítricos</b>	<b>22</b>
<i>I.2.2.1.- Tratamiento del fruto</i>	<b>24</b>
<i>I.2.2.2.- Extracción del zumo</i>	<b>24</b>
<i>I.2.2.3.- Tratamiento del zumo</i>	<b>25</b>
<i>I.2.2.4.- Concentración y enfriamiento final del zumo cítrico</i>	<b>27</b>
<b>I.2.3.- Aprovechamiento de subproductos cítricos</b>	<b>28</b>
<b>II.-COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMOS CÍTRICOS</b>	<b>29</b>
<b>II.1.- IMPORTANCIA DEL AROMA EN LA CALIDAD DEL ZUMO           INDUSTRIAL</b>	<b>31</b>
<b>II.2.- COMPONENTES VOLÁTILES CARACTERÍSTICOS DEL           ZUMO DE NARANJA</b>	<b>37</b>
<b>II.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS DE EXTRACCIÓN E           IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES</b>	<b>47</b>
<b>II.3.1.- Análisis de componentes volátiles</b>	<b>49</b>
<i>II.3.1.1.- Inyección directa de la muestra en cromatografía de</i>	<b>50</b>



gases	
II.3.1.2.- <i>Extracción directa con disolvente en muestras acuosas</i>	<b>51</b>
II.3.1.3.- <i>Destilación de la muestra seguida de extracción con disolvente</i>	<b>54</b>
II.3.1.4.- <i>Destilación-Extracción simultánea</i>	<b>57</b>
II.3.1.5.- <i>Concentración de los componentes volátiles</i>	<b>60</b>
<b>II.3.2.- Determinación de componentes volátiles en espacio de cabeza</b>	<b>62</b>
II.3.2.1.- <i>Espacio de cabeza estático</i>	<b>64</b>
II.3.2.2.- <i>Espacio de cabeza dinámico / Purga y Trampa</i>	<b>65</b>
<b>II.3.3.- Microextracción en fase sólida</b>	<b>69</b>
II.3.3.1.- <i>Naturaleza del recubrimiento de la fibra</i>	<b>71</b>
II.3.3.2.- <i>Mecanismo del proceso en SPME</i>	<b>72</b>
II.3.3.3.- <i>Efecto de la agitación en SPME por inmersión</i>	<b>75</b>
II.3.3.4.- <i>Análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza mediante SPME</i>	<b>76</b>
II.3.3.5.- <i>Optimización de SPME en espacio de cabeza</i>	<b>80</b>
II.3.3.5.1.- <i>Efecto de la agitación de la fase acuosa</i>	<b>80</b>
II.3.3.5.2.- <i>Efecto de la temperatura</i>	<b>81</b>
II.3.3.5.3.- <i>Efecto de la adición de sal</i>	<b>82</b>
II.3.3.6.- <i>Naturaleza del recubrimiento y manipulación de la fibra</i>	<b>84</b>
II.3.3.7.- <i>Análisis cuantitativo en SPME</i>	<b>87</b>
<b>II.3.4.- Separación e identificación de componentes volátiles</b>	<b>89</b>
II.3.4.1.- <i>Cromatografía de gases multidimensional</i>	<b>90</b>
II.3.4.2.- <i>Captura iónica - Espectrometría de masas</i>	<b>93</b>
II.3.4.3.- <i>Cromatografía de gases olfatométrica</i>	<b>94</b>
II.3.4.4.- <i>Nariz electrónica, instrumentos sensoriales que emulan la nariz humana</i>	<b>99</b>
II.3.4.5.- <i>Determinación de enantiómeros y su importancia en el análisis de alimentos</i>	<b>100</b>

II.3.4.6.- <i>Cromatografía líquida de alta presión</i>	102
<b>II.4.- ALTERACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DURANTE EL PROCESADO Y EL ALMACENAMIENTO</b>	<b>103</b>
II.4.1.- <b>Alteración del aroma durante el procesado industrial</b>	<b>104</b>
II.4.2.- <b>Alteración del aroma durante el almacenamiento</b>	<b>112</b>
<b>III.- MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>123</b>
III.1.- <b>ZUMO DE NARANJA</b>	<b>125</b>
III.2.- <b>TOMA DE MUESTRAS</b>	<b>127</b>
III.3.- <b>EXTRACCIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES</b>	<b>128</b>
III.3.1.- <b>Destilación-extracción simultánea</b>	<b>128</b>
III.3.2.- <b>Concentración de componentes volátiles totales</b>	<b>131</b>
III.4.- <b>COMPONENTES VOLÁTILES EN ESPACIO DE CABEZA. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA</b>	<b>132</b>
III.4.1.- <b>Optimización de la extracción</b>	<b>138</b>
III.4.1.1.- <i>Aumento de la temperatura</i>	<b>139</b>
III.4.1.2.- <i>Aumento de la fuerza iónica</i>	<b>139</b>
III.4.1.3.- <i>Agitación de la muestra</i>	<b>140</b>
III.4.2.- <b>Determinación de los tiempos de equilibrio</b>	<b>140</b>
III.4.3.- <b>Preparación de la muestra</b>	<b>141</b>
III.5.- <b>CROMATOGRAFÍA GASEOSA. ESPECTROMETRÍA DE MASAS</b>	<b>142</b>
III.5.1.- <b>Análisis cualitativo y cuantitativo de componentes Volátiles. SDE</b>	<b>142</b>
III.5.1.1.- <i>Identificación de componentes</i>	<b>143</b>
III.5.1.2.- <i>Valoración cuantitativa de volátiles mediante SDE</i>	<b>144</b>

III.5.1.3.- <i>Recuperación de componentes volátiles en SDE</i>	145
III.5.2.- <b>Análisis cualitativo y cuantitativo de componentes volátiles en espacio de cabeza. SPME</b>	148
III.5.2.1.- <i>Identificación de componentes</i>	149
III.5.2.2.- <i>Valoración cuantitativa</i>	149
<b>IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>153</b>
IV.1.- <b>RECUPERACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES MEDIANTE DESTILACIÓN-EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA</b>	155
IV.2.- <b>DETERMINACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES MEDIANTE HS-SPME. OPTIMIZACIÓN Y TIEMPOS DE EQUILIBRIO</b>	162
IV.2.1.- <b>Efecto de la Temperatura</b>	163
IV.2.2.- <b>Efecto de la adición de NaCl</b>	166
IV.2.3.- <b>Efecto de la Agitación</b>	171
IV.2.4.- <b>Tiempos de Equilibrio</b>	174
IV.2.4.1.- <i>Tiempos de equilibrio en PDMS</i>	175
IV.2.4.2.- <i>Tiempos de equilibrio en PA</i>	183
IV.2.5.- <i>Tiempos de adsorción</i>	188
IV.3.- <b>ANÁLISIS DE COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA</b>	190
IV.3.1.- <b>Componentes volátiles .SDE</b>	190
IV.3.1.1.- <i>Zumo de naranja exprimido a mano</i>	191
IV.3.1.2.- <i>Zumo de naranja comercial</i>	196
V.3.1.3.- <i>Análisis estadístico</i>	203
IV.3.2.- <b>Componentes volátiles. HS-SPME</b>	204
IV.3.2.1.- <i>Zumo de naranja exprimido a mano</i>	205

IV.3.2.1.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	205
IV.3.2.1.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	210
IV.3.2.2.- <i>Zumo de naranja comercial</i>	214
IV.3.2.2.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	214
IV.3.2.2.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	219
IV.3.2.3.- <i>Análisis estadístico</i>	223
IV.3.2.3.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	223
IV.3.2.3.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	224
<b>IV.4.- EFECTO DEL PROCESADO SOBRE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL ZUMO</b>	<b>229</b>
IV.4.1.- <b>Efecto de la centrifugación. Separación de pulpa fina</b>	<b>230</b>
IV.4.1.1.- <i>Componentes volátiles. SDE</i>	230
IV.4.1.2.- <i>Análisis estadístico</i>	237
IV.4.1.3.- <i>Componentes volátiles. HS-SPME</i>	238
IV.4.1.3.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	239
IV.4.1.3.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	245
V.4.1.4.- <i>Análisis estadístico</i>	251
IV.4.2.- <b>Efecto del desaireado-desaceitado</b>	<b>255</b>
IV.4.2.1.- <i>Componentes volátiles. SDE</i>	255
IV.4.2.2.- <i>Análisis estadístico</i>	260
IV.4.2.3.- <i>Componentes volátiles. HS-SPME</i>	261
IV.4.2.3.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	262
IV.4.2.3.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	266
IV.4.2.4.- <i>Análisis estadístico</i>	271
IV.4.3.- <b>Efecto de la pasteurización</b>	<b>274</b>
IV.4.3.1.- <i>Componentes volátiles. SDE</i>	274
IV.4.3.2.- <i>Análisis estadístico</i>	276
IV.4.3.3.- <i>Componentes volátiles. HS-SPME</i>	277
IV.4.3.3.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	277
IV.4.3.3.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	278

IV.4.3.4.- <i>Análisis estadístico</i>	278
IV.4.3.4.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	278
IV.4.3.4.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	279
<b>IV.4.4.-Efecto global del procesado sobre los componentes volátiles. Zumo refinado-Zumo pasteurizado.</b>	<b>280</b>
IV.4.4.1.- <i>Componentes volátiles. SDE</i>	281
IV.4.4.2.- <i>Componentes volátiles. HS-SPME</i>	284
IV.4.4.2.1.- <i>Extracción mediante PDMS</i>	285
IV.4.4.2.2.- <i>Extracción mediante PA</i>	288
<b>IV.5.-. DISTRIBUCIÓN DE VOLÁTILES ENTRE PULPA Y SUERO EN EL ZUMO DE NARANJA</b>	<b>290</b>
IV.5.1.- <b>Distribución de componentes volátiles. SDE</b>	<b>290</b>
IV.5.2.- <b>Distribución de componentes volátiles. HS-SPME</b>	<b>296</b>
<b>IV.6.-.COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN SUBPRODUCTOS. PULPA GRUESA</b>	<b>305</b>
<b>IV.7.-. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL ZUMO DE NARANJA</b>	<b>309</b>
IV.7.1.- <b>Evolución de los componentes volátiles. SDE</b>	<b>310</b>
IV.7.2.- <b>Evolución de los componentes volátiles. HS-SPME</b>	<b>312</b>
<b>V.- CONCLUSIONES</b>	<b>315</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>323</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>343</b>

## **INDEX**

<b>OBJETIVES</b>	<b>1</b>
<b>I.- BACKGROUND</b>	<b>7</b>
<b>I.1.- PRODUCTION AND INDUSTRIAL TRANSFORMATION OF THE ORANGE FRUIT AT THE REGION OF MURCIA</b>	<b>11</b>
<b>I.2.- INDUSTRIAL PROCESSING OF ORANGE FRUIT</b>	<b>15</b>
<b>I.2.1.- Orange fruit. Raw material for citrus industry</b>	<b>17</b>
<b>I.2.2.- Citrus juices processing</b>	<b>22</b>
I.2.2.1.- <i>Orange fruit handling</i>	<b>24</b>
I.2.2.2.- <i>Juice extraction</i>	<b>24</b>
I.2.2.3.- <i>Orange juices technological treatment</i>	<b>25</b>
I.2.2.4.- <i>Concentration and final cooling of the orange juice</i>	<b>27</b>
<b>I.2.3.- Use of wasting citrus products</b>	<b>28</b>
<b>II.-VOLATILE COMPONENTS IN CITRUS JUICES</b>	<b>29</b>
<b>II.1.- IMPORTANCE OF THE AROMA IN THE INDUSTRIAL JUICE QUALITY</b>	<b>31</b>
<b>II.2.- CHARACTERISTIC ORANGE JUICE VOLATILE COMPONENTS</b>	<b>37</b>
<b>II.3.- ANALYTICAL METHODS FOR ISOLATION AND IDENTIFICATION OF VOLATILE COMPONENTS</b>	<b>47</b>

<b>II.3.1.- Volatile components analysis</b>	<b>49</b>
II.3.1.1.- <i>Direct sample injection in gas chromatography</i>	<b>50</b>
II.3.1.2.- <i>Direct solvent extraction from aqueous samples</i>	<b>51</b>
II.3.1.3.- <i>Sample distillation followed by solvent extraction</i>	<b>54</b>
II.3.1.4.- <i>Simultaneous Distillation-Extraction</i>	<b>57</b>
II.3.1.5.- <i>Volatile components concentration</i>	<b>60</b>
<b>II.3.2.- Determination of headspace volatile components</b>	<b>62</b>
II.3.2.1.- <i>Static headspace</i>	<b>64</b>
II.3.2.2.- <i>Dynamic headspace /Purge and Tramp</i>	<b>65</b>
<b>II.3.3.- Solid phase Microextraction</b>	<b>69</b>
II.3.3.1.- <i>Polymeric fibre coating</i>	<b>71</b>
II.3.3.2.- <i>SPME mechanism process</i>	<b>72</b>
II.3.3.3.- <i>Effect of stirring by immersion on SPME</i>	<b>75</b>
II.3.3.4.- <i>Analysis of headspace volatile components by SPME</i>	<b>76</b>
II.3.3.5.- <i>Headspace SPME optimization</i>	<b>80</b>
II.3.3.5.1.- <i>Effect of the aqueous phase stirring</i>	<b>80</b>
II.3.3.5.2.- <i>Temperature effect</i>	<b>81</b>
II.3.3.5.3.- <i>Salt addition effect</i>	<b>82</b>
II.3.3.6.- <i>Fibre handling and polymeric coating nature</i>	<b>84</b>
II.3.3.7.- <i>SPME quantitative analysis</i>	<b>87</b>
<b>II.3.4.- Volatile components isolation and identification</b>	<b>89</b>
II.3.4.1.- <i>Multidimensional gas chromatography</i>	<b>90</b>
II.3.4.2.- <i>Ionic capture. Mass spectrometry</i>	<b>93</b>
II.3.4.3.- <i>Olfactometry gas chromatography</i>	<b>94</b>
II.3.4.4.- <i>Electronic nose, sensorial instruments which emulate Human nose</i>	<b>99</b>
II.3.4.5.- <i>Enantiomer determinations and their importance in food analysis</i>	<b>100</b>



II.3.4.6.- <i>High performance liquid chromatography</i>	102
<b>II.4.- CHEMICAL MODIFICATIONS OF VOLATILE COMPONENTS DURING INDUSTRIAL PROCESSING AND STORAGE CONDITIONS</b>	<b>103</b>
II.4.1.- <b>Aroma modifications during industrial processing</b>	<b>104</b>
II.4.2.- <b>Aroma modifications during storage</b>	<b>112</b>
<b>III.- MATERIAL AND METHODS</b>	<b>123</b>
<b>III.1.- ORANGE JUICE</b>	<b>125</b>
<b>III.2.- ORANGE JUICE SAMPLES</b>	<b>127</b>
<b>III.3.- VOLATILE COMPONENTS EXTRACTION</b>	<b>128</b>
III.3.1.- <b>Simultaneous Distillation Extraction</b>	<b>128</b>
III.3.2.- <b>Volatile components concentration</b>	<b>131</b>
<b>III.4.- HEADSPACE VOLATILE COMPONENTS. SOLID PHASE MICROEXTRACTION</b>	<b>132</b>
III.4.1.- <b>Optimization of the Extraction</b>	<b>138</b>
III.4.1.1.- <i>Increase of temperature</i>	<b>139</b>
III.4.1.2.- <i>Increase of ionic strength</i>	<b>139</b>
III.4.1.3.- <i>Stirring of the sample</i>	<b>140</b>
III.4.2.- <b>Equilibrium time determinations</b>	<b>140</b>
III.4.3.- <b>Sample preparation</b>	<b>141</b>
<b>III.5.- GAS CHROMATOGRAPHY. MASS SPECTROMETRY</b>	<b>142</b>
III.5.1.- <b>Qualitative and quantitative analysis of volatile components. SDE</b>	<b>142</b>
III.5.1.1.- <i>Identification of volatile components</i>	<b>143</b>
III.5.1.2.- <i>Quantitative analysis of volatile components by SDE</i>	<b>144</b>

III.5.1.3.- <i>Volatile components recovery using SDE</i>	145
III.5.2.- <b>Qualitative and quantitative analysis of headspace volatile components. SPME</b>	
III.5.2.1.- <i>Qualitative analysis</i>	149
III.5.2.2.- <i>Quantitative analysis</i>	149
<b>IV. RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>153</b>
<b>IV.1.-VOLATILE COMPONENTS RECOVERY USING SIMULTANEOUS DISTILLATION EXTRACTION</b>	<b>155</b>
<b>IV.2.- VOLATILE COMPONENTS DETERMINATION BY HS-SPME. OPTIMIZATION AND EQUILIBRIUM TIMES</b>	<b>162</b>
IV.2.1.- <b>Temperature effect</b>	<b>163</b>
IV.2.2.- <b>NaCl addition effect</b>	<b>166</b>
IV.2.3.- <b>Stirring effect</b>	<b>171</b>
IV.2.4.- <b>Equilibrium times</b>	<b>174</b>
IV.2.4.1.- <i>PDMS equilibrium times</i>	<b>175</b>
IV.2.4.2.- <i>PA equilibrium times</i>	<b>183</b>
IV.2.5.- <i>Adsorption times</i>	<b>188</b>
<b>IV.3.- VOLATILE COMPONENTS ANALYSIS IN ORANGE JUICE</b>	<b>190</b>
IV.3.1.- <b>Volatile components .SDE</b>	<b>190</b>
IV.3.1.1.- <i>Hand squeezed orange juice</i>	<b>191</b>
IV.3.1.2.- <i>Commercial orange juices</i>	<b>196</b>
V.3.1.3.- <i>Statistical analysis</i>	<b>203</b>
IV.3.2.- <b>Volatile components. HS-SPME</b>	<b>204</b>
IV.3.2.1.- <i>Hand squeezed orange juice</i>	<b>205</b>

IV.3.2.1.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	205
IV.3.2.1.2.- <i>Extraction using PA</i>	210
IV.3.2.2.- <i>Commercial orange juices</i>	214
IV.3.2.2.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	214
IV.3.2.2.2.- <i>Extraction using PA</i>	219
IV.3.2.3.- <i>Statistical analysis</i>	223
IV.3.2.3.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	223
IV.3.2.3.2.- <i>Extraction using PA</i>	224
<b>IV.4.- EFFECT OF THE INDUSTRIAL PROCESSING ON THE ORANGE JUICE VOLATILE COMPONENTS</b>	<b>229</b>
<b>IV.4.1.- Effect of the centrifugation process. Pulp separation</b>	<b>230</b>
IV.4.1.1.- <i>Volatile components. SDE</i>	230
IV.4.1.2.- <i>Statistical analysis</i>	237
IV.4.1.3.- <i>Volatile components. HS-SPME</i>	238
IV.4.1.3.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	239
IV.4.1.3.2.- <i>Extraction using PA</i>	245
V.4.1.4.- <i>Statistical analysis</i>	251
<b>IV.4.2.- Effect of the deaeration process</b>	<b>255</b>
IV.4.2.1.- <i>Volatile components. SDE</i>	255
IV.4.2.2.- <i>Statistical analysis</i>	260
IV.4.2.3.- <i>Volatile components. HS-SPME</i>	261
IV.4.2.3.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	262
IV.4.2.3.2.- <i>Extraction using PA</i>	266
IV.4.2.4.- <i>Statistical analysis</i>	271
<b>IV.4.3.- Effect of the pasteurization process</b>	<b>274</b>
IV.4.3.1.- <i>Volatile components. SDE</i>	274
IV.4.3.2.- <i>Statistical analysis</i>	276
IV.4.3.3.- <i>Volatile components. HS-SPME</i>	277
IV.4.3.3.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	277

IV.4.3.3.2.- <i>Extraction using PA</i>	278
IV.4.3.4.- <i>Statistical analysis</i>	278
IV.4.3.4.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	278
IV.4.3.4.2.- <i>Extraction using PA</i>	279
<b>IV.4.4.- Global effect of the industrial processing on the volatile fraction. Finished juice-Pasteurized juice.</b>	<b>280</b>
IV.4.4.1.- <i>Volatile components. SDE</i>	281
IV.4.4.2.- <i>Volatile components. HS-SPME</i>	284
IV.4.4.2.1.- <i>Extraction using PDMS</i>	285
IV.4.4.2.2.- <i>Extraction using PA</i>	288
<b>IV.5.- VOLATILE COMPONENTS DISTRIBUTION BETWEEN PULP AND YIELD IN ORANGE JUICE</b>	<b>290</b>
IV.5.1.- <b>Volatile components distribution. SDE</b>	290
IV.5.2.- <b>Volatile components distribution. HS-SPME</b>	296
<b>IV.6.- VOLATILE COMPONENTS IN WASTE INDUSTRIAL PRODUCTS. THICK PULP</b>	<b>305</b>
<b>IV.7.- SEASON INFLUENCE ON THE ORANGE JUICE AROMATIC FRACTION</b>	<b>309</b>
IV.7.1.- <b>Evolution of total volatile components. SDE</b>	310
IV.7.2.- <b>Evolution of volatile components. HS-SPME</b>	312
<b>V.- CONCLUSIONS</b>	<b>315</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAPHY</b>	<b>323</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>343</b>

**OBJETO**



El estudio de los constituyentes aromáticos en alimentos ha sido un desafío para numerosos investigadores durante las últimas cuatro décadas y su desarrollo unido al del análisis instrumental, concretamente la cromatografía gaseosa, ha permitido la apertura de un nuevo campo de investigación con numerosas posibilidades de aplicación en la industria alimentaria.

Desde la introducción en 1950 de la cromatografía gaseosa, esta ha sido la piedra angular en el campo del análisis de componentes volátiles (Wright, 1997). El primer análisis de componentes volátiles en zumo de naranja dulce empleando cromatografía gas-líquido fue realizado en 1961 por Wolford y Attaway, desde entonces numerosos trabajos se han realizado con diferentes objetivos, tales como conocer la calidad del aroma en la fruta fresca o en los productos derivados, el estudio de la calidad tecnológica y prevenir las reacciones de degradación de los mismos (Pino *et al.*, 1981).

Actualmente el análisis de los componentes responsables del aroma, abarca a todos los productos alimenticios e incluye una cantidad considerable de campos de investigación entre ellos el área de las frutas cítricas. De la totalidad de bebidas de frutas, la naranja es la más popular dado su delicado y complejo aroma cítrico (Shaw *et al.* 1993), por lo que el desarrollo de nuevas y más eficientes técnicas para la determinación de componentes volátiles aromáticos resulta esencial. Estos métodos son cruciales para la investigación de efectos tales como el procesado, el tiempo de almacenamiento y empaquetado, la vida media..., al actuar como monitores de la calidad del zumo.

Las características de los zumos presentan grandes variaciones a lo largo del periodo de producción citrícola debido a las diferentes variedades de naranja utilizadas y a los cambios de atributos sensoriales que experimentan durante la maduración, haciendo difícil la preparación de productos de calidad uniforme durante todo el año .

El tema referente al deterioro de los zumos de naranja durante el procesado y el almacenamiento, constituye uno de los tópicos más abordados en Tecnología de Alimentos, tanto por su impacto como por sus derivaciones nutricionales, económicas, etc...

La industria alimentaria es particularmente consciente de la importancia del aroma en la aceptación de los alimentos por parte del consumidor, principalmente en regiones mediterráneas altamente productoras como es el caso de la Región de Murcia.

Por este motivo en esta memoria de Tesis doctoral abordamos el estudio de la fracción aromática total y en espacio de cabeza de zumo de naranja, aplicando para ello diferentes técnicas analíticas contrastadas entre sí. Considerando el efecto de las distintas etapas del procesado industrial, así como el grado de madurez del fruto sobre la fracción aromática del zumo.



Los objetivos establecidos para el desarrollo de este trabajo son:

1.- Optimización y adecuación de las técnicas analíticas empleadas en la determinación de los constituyentes volátiles de la naranja.

2.- Efecto de las diferentes etapas del procesado industrial sobre la fracción aromática.

3.- Componentes volátiles presentes en la pulpa gruesa extraída del zumo de naranja y su posible aplicación como fuente aromática.

4.- Efecto del grado de madurez del fruto sobre la composición aromática del zumo.

## **I.- INTRODUCCIÓN**



Los frutos cítricos, de entre los que se destaca la naranja, se incluyen dentro de la clasificación botánica de las Rutáceas, subfamilia Aurantioideas, en la que se incluye el género Citrus del que se deriva su nombre genérico y cuyas especies más importantes se especifican en la Tabla I.-1.

Aparte de la taxonomía Botánica los cítricos pueden clasificarse por su interés para el hombre en tres categorías o grupos (Fernández, 1995). El primer grupo comprende las naranjas, tangerinas, mandarinas y tipos similares, el segundo grupo limones y limas, y por último el tercer grupo, con los pomelos.

El grupo primero es el más importante y alcanza un 80% de la producción, siendo las naranjas dulces la especie más destacada dentro del mismo. En efecto, dentro del conjunto de todos los frutos cítricos la naranja ocupa un 67% de la producción mundial.

Tabla I.-1.- **CLASIFICACIÓN DE LOS FRUTOS CÍTRICOS**

<b>NARANJAS</b>	Naranja Dulce	<i>Citrus sinensis</i> L.
	Naranja Amarga	<i>Citrus aurantium</i> L.
<b>MANDARINAS</b>	Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>
	Clementina	<i>Citrus reticulata</i>
	Satsuma	<i>Citrus unshiu</i>
	Tangerina	<i>Citrus deliciosa</i>
<b>POMELOS</b>	Pomelo	<i>Citrus grandis</i>
	Toronja	<i>Citrus paradisi</i>
<b>LIMONES</b>	Limón	<i>Citrus limonum</i>
	Lima	<i>Citrus aurantifolia</i>
	Cidra	<i>Citrus medica</i> L.
<b>OTROS CITRICOS</b>	Fortunela ó Kumcuat	<i>Fortunella japonica</i>

## **I.1.- PRODUCCIÓN E INDUSTRIALIZACIÓN DE LA NARANJA EN LA REGIÓN DE MURCIA**

El cultivo de los cítricos en general, se efectúa en todas las zonas tropicales y subtropicales y constituye un sector importante de la economía frutícola mundial.

Se cultivan en más de cien países siendo sólo unos cuantos los que dominan la producción; según datos de la F.A.O. Brasil, Estados Unidos, España, Méjico e Italia son los principales países productores por orden decreciente de importancia.

En España, dentro de la zona denominada del Mediterráneo, el cultivo de los cítricos se realiza principalmente en las zonas costeras del Este y Sureste (Levante) y en la región Sur de la península, Andalucía, desde Almería hasta Huelva y se localiza sobre todo en lugares próximos al litoral y en los valles de los ríos.

La zona citrícola de Levante comprende las provincias de Tarragona, Castellón, Valencia, Alicante y Murcia. La superficie dedicada al cultivo de naranjos en la Región de Murcia ha evolucionado desde 8551 Hectáreas cultivadas en 1990, hasta 9502 Ha en 1996 (Anuario estadístico de la Región de Murcia, 1996).

Así, según los datos obtenidos por el Departamento de Estadística Agraria, de la Conserjería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua de la Región de Murcia, la producción de naranja por variedades, desde la campaña de 1991-1992, hasta la de 1997-1998, ha modificado su volumen producido de 111.650 a 85.872 Toneladas, según se muestra en la Tabla I.1.-1.

El contraste que supone la diferencia de los datos obtenidos entre el crecimiento de la superficie dedicada al cultivo de naranja y la disminución de la producción, está relacionada con una importante renovación de arboleda, por lo que los naranjos no se encuentran en su máximo nivel de producción.

Por otro lado, en la actualidad se ubican en la Región de Murcia catorce industrias dedicadas a la transformación de frutos cítricos, principalmente extracción de zumos y elaboración de otros derivados; su capacidad media puede situarse en torno a las 179.323 Toneladas por campaña. Este dato no informa de la cantidad del fruto que en nuestra Región se destina a la industria, ya que al no existir hasta el momento en España barreras controladas de comercio entre las regiones productoras, se desconoce que parte de esta cantidad procede de otras Comunidades Autónomas, en las que los periodos de producción no coinciden totalmente con los nuestros por motivos climatológicos.

A nivel nacional, los datos accesibles en la actualidad corresponden a la campaña de 1993-1994, en los que la producción total de naranja dulce fue de 2.697.543 Toneladas, de ellas 1.337.733 se dedicaron a la exportación, 972.419 Tm al consumo interior en fresco y 387.391 Tm a su transformación industrial, por lo que aproximadamente un 13 % de la producción total se destina hacia la industria.

Refiriéndonos a las Comunidades autonómicas productoras, la Región de Murcia uniprovincial se sitúa en el tercer lugar, con un 3% de la producción total de naranja española. En la Tabla I.1.-2., quedan reflejados los datos elaborados por el Servicio de Estadística, de la Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua, correspondientes a la producción en Toneladas métricas de cada una de las Comunidades Autónomas españolas dedicadas al cultivo del naranjo, siendo la Comunitat Valenciana la primera productora de naranja a nivel nacional.

Tabla I.1.-1. EVOLUCION DE LA PRODUCCIÓN DE NARANJA POR  
VARIEDADES EN LA REGION DE MURCIA (Tm)

Variedades	Campaña							
		1991-92	1992-93	1993-94	1994-95	1995-96	1996-97	1997-98
<b>Navel</b>		62.600	80.000	55.970	43.040	43.120	34.720	49.097
Navelina y New-Hall		39.750	54.000	35.000	27.350	23.340	18.300	25.892
Navel		15.050	13.900	10.050	8.250	8.200	6.200	7.629
Navelate		7.800	12.100	10.920	7.440	11.580	10.220	15.576
<b>Blancas selectas</b>		10.120	9.850	8.610	6.970	6.540	5.620	6.160
Salustiana		9.400	9.300	8.400	6.520	6.330	5.500	6.028
Otras		720	550	210	450	210	120	132
<b>Blancas comunes</b>		480	250	490	140	100	60	70
<b>Sanguinas</b>		4.350	3.700	3.185	1.360	1.580	1.100	1.010
<b>Tardías</b>		34.100	41.900	34.860	22.250	26.850	22.600	29.535
Verna		13.050	13.100	9.360	5.500	7.150	5.100	4.660
Valencia late		21.050	28.800	25.500	16.750	19.700	17.500	24.875
<b>Total</b>		<b>111.650</b>	<b>135.700</b>	<b>103.115</b>	<b>73.760</b>	<b>78.190</b>	<b>64.100</b>	<b>85.872</b>

Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua. Dpto. de Estadística Agraria de Murcia 1997/1998



Tabla I.1.-2.- ANÁLISIS PROVINCIAL DE LA PRODUCCIÓN DE NARANJA EN 1994

COMUNIDADES AUTÓNOMAS	PRODUCCIÓN (Tm)
GALICIA	1.907
CANTABRIA	33
PAIS VASCO	6
CATALUÑA	35.857
BALEARES	16.505
CASTILLA Y LEON	34
Comunitat VALENCIANA	2.085.863
Región de MURCIA	<b>73.620</b>
EXTREMADURA	353
ANDALUCIA	457.644
CANARIAS	25.721
<b>Total ESPAÑA</b>	<b>2.697.543</b>

## I.2.- TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL DE LA NARANJA

La vida de muchos frutos en su estado fresco en ocasiones es corta, por lo que es necesario buscar formas de consumo diversas, tales como pueden ser la preparación a partir de los mismos de diferentes tipos de conservas y productos alimenticios como mermeladas, zumos, néctares, etc.

En el caso de los frutos cítricos (naranja, limón y pomelo) su consumo es muy popular en forma de zumos en los países desarrollados, hasta tal punto que se calcula que el zumo de naranja representa el 50% del consumo total de zumos en el mundo entero. Actualmente el zumo de naranja elaborado directamente sin concentración previa constituye en Estados Unidos un producto de consumo de extraordinaria importancia (Katz y Giese, 1998).

De acuerdo con la legislación actual (R.D. 1650/1991), los tipos de zumos y néctares que se pueden producir se clasifican en:

1.- *Zumos frescos de fruta*: Son los jugos obtenidos a través de frutos sanos, frescos, maduros y lavados obtenidos mediante procesado industrial autorizado. Estarán constituidos por el líquido solo, clarificado, o por el líquido y pulpa en suspensión correspondientes al endocarpio y estarán exentos de restos de epicarpio, mesocarpio y semillas.

2.- *Zumos naturales*: Son los zumos frescos que han sido estabilizados mediante tratamiento físico autorizado que garantice su conservación. Debe existir la posibilidad de hacerlos fermentar.

3.- *Zumos conservados*: Son los zumos frescos o naturales a los que se ha añadido un agente conservador.

4.- *Zumos básicos de fruta*: Son zumos frescos cuya conservación definitiva está asegurada por procedimientos físicos o agentes

conservadores autorizados y que no se pueden consumir en estado natural, sino que sirven de base a otros productos.

5.- *Zumos concentrados*: Son los obtenidos a partir de zumos frescos o naturales, mediante la extracción del 50% como mínimo, del agua de constitución, empleando procesos tecnológicos autorizados y podrán conservarse por procedimientos físicos. Estos zumos concentrados, diluidos en agua potable y devueltos a su densidad original han de presentar las mismas características de los zumos empleados.

6.- *Zumos concentrados conservados*: Son los zumos concentrados a los que se les ha añadido un agente conservador autorizado.

7.- *Zumos ligeramente azucarados*: Son los zumos frescos, naturales, concentrados y conservados a los que se les ha añadido algunos de los edulcorantes autorizados. La cantidad total de edulcorantes será inferior a los 70 g, expresados en sacarosa por Kg de zumo.

8.- *Zumos azucarados*: Son los zumos frescos, naturales, concentrados y conservados a los que se les ha añadido edulcorantes naturales en cantidad superior a los 70 e inferior a los 150 g/Kg de producto.

9.- *Zumos gasificados*: Son los procedentes de los zumos de fruta anteriormente definidos a los que se les ha añadido anhídrido carbónico puro.

10.- *Néctares*: Son los productos obtenidos con zumos frescos, naturales y conservados a los que se le ha añadido un jarabe del mismo grado Brix que el zumo original en proporción superior al 40% e

inferior al 60%. Los azúcares totales expresados en sacarosa serán inferiores al 30%.

11.-*Zumo deshidratado de frutas*: Es el obtenido a partir de zumo fresco clarificado en el que el contenido en agua es inferior al 10%.

Veamos a continuación los requisitos establecidos acerca de las características de la materia prima y el procesado industrial de la elaboración de los zumos cítricos (Carpena, 1963; Carpena y Laencina, 1971; Safina 1971; Di Giacomo 1980; Braverman, 1952); Kimball, 1991).

#### **1.2.1.- Naranja. Materia prima para la industria cítrica**

La industria necesita fruta de una calidad distinta a la que interesa para el comercio en fresco.

Según Primo Yúfera (Fernández, 1995), son cuatro las condiciones que debería reunir las naranjas para la industria:

- 1.- Tanto por ciento de zumo.
- 2.- Grados Brix.
- 3.- Color.
- 4.- Periodo de utilización.

Una variedad industrialmente ideal tendría un porcentaje elevado de zumo, con un elevado porcentaje de sólidos solubles (azúcar), baja acidez, fuerte coloración y un periodo de utilización largo. A estas condiciones deberíamos de añadir otras cualidades no menos importantes para la fabricación de zumos, entre las que habría que destacar las responsables de características sensoriales como la

turbidez y especialmente el aroma. Las variedades que ahora se industrializan alcanzan rendimientos en zumos que pueden alcanzar hasta el 40% y un contenido en sólidos solubles, del orden de 10,5-12,0° Brix.

En general las variedades que actualmente extienden su cultivo son las destinadas a la exportación en fresco, destinándose una pequeña parte a su industrialización, usualmente procedente de los destríos y en algunos casos de excedentes de producción, accidentes climatológicos, etc. La industria no puede competir con los precios de la fruta en el árbol destinada al consumo en fresco, por lo que se dirige la producción hacia derivados de aquellas frutas que no son aptas para su comercio en fresco, debido a su tamaño, aspecto poco comercial,...

La diversificación de las variedades existentes, algunas de ellas poco aptas para la industria no cubren las exigencias de la misma; junto a esto la irregularidad del abastecimiento, son las principales causas que limitan el crecimiento normal de la industria citrícola en nuestro país.

Las variedades de naranja existentes en España y su aptitud para la industrialización permiten realizar su clasificación en tres grandes grupos:

- 1.- Blancas y blancas tardías (*Valencia Late* y *Bernas*)
- 2.- Sanguinas (pigmentadas)
- 3.- Navel o umblicadas.

Entre las variedades del grupo de las blancas destaca la "Comuna", con la cual se obtienen buenos rendimientos y excelentes zumos ricos en vitamina C, además esta variedad contiene una proporción en aceite esencial superior a otras. No obstante, como posee muchas semillas, no es comercial en el mercado en fresco por lo que se limita su cultivo y está en trance de desaparecer.

Las “Cadeneras”, otra variedad dentro de las blancas, también ofrecen mucho zumo y de excelente calidad; las “Castellanas”, se caracterizan por generar zumo de escasa acidez, por lo que son aptas para asociarlas con otras y conseguir un zumo de relación Azúcar/Acidez más alta.

Dentro del grupo de las blancas las “Salustianas”, es la variedad que actualmente presenta mayor interés comercial e industrial. La variedad “Valencia Late”, ofrece un gran contenido en sólidos, un gran porcentaje de zumo, buen color y sin semillas; su producción es tardía por lo que alcanza buenos precios en el mercado. La “Berna”, con buen contenido en zumo de calidad, es también una variedad tardía que se recolecta a finales de marzo.

El grupo de las “Sanguinas” se caracteriza porque son frutos que presentan en el flavedo de la corteza y en la pulpa comestible un color sanguino característico, debido a su contenido en pigmentos rojo-oscuros, hidrosolubles, de naturaleza antocianica.

Estas naranjas, denominadas rojas o de sangre, poseen zumos de excelente sabor y aroma, aunque tienen el inconveniente del color rojizo, más o menos pronunciado, característico de los frutos y que en procesado térmico se deteriora por oscurecimiento. Las variedades de este grupo son la “Doble Fina”, “Sanguina Oval”, “Entre Finas” y la “Sanguinelli”. Recientemente, y como consecuencia de las propiedades medicinales asociadas a polifenoles como los antocianos se está desarrollando un mercado de zumo de estas variedades en zonas productoras especialmente importantes como Italia.

Las naranjas del grupo “Navel”: “Washington Navel”, “Thomson Navel”, “Navelina” y “Navelate”, ..., tienen limitada su aplicación industrial como consecuencia del elevado contenido en limonoides del zumo, entre los que destaca la limonina (glucósido que se hidroliza impartiendo un fuerte sabor amargo a los zumos en el proceso de tratamiento térmico y que lo hace inadecuado para el consumo).

Existen dos variedades de naranjas Navel en las que este fenómeno es menos acusado por su bajo contenido en limonina, “Navelate” y “Navel-Golosa”. En estas variedades la madurez externa del fruto, lleva un ligero retraso con relación a la “Washington Navel”, teniendo un amplio periodo de recolección que abarca de febrero a mayo en condiciones comerciales perfectas. Se trata, pues, de una variedad de muy buena calidad para el consumo directo y para la industria.

Las variedades “Newhall”y “Navelina”, son las que actualmente presentan mayor interés, debido a su precocidad, rápida entrada en producción y buena productividad. La “Washington Navel”, la “Salustiana” y la “Valencia Late”, tienen una difusión más moderada implantándose especialmente en zonas de maduración media o tardía. La “Navelate”, a pesar de su excelente calidad se difunde con lentitud debido a problemas de productividad.

Una vez descritas las variedades de naranjas cultivadas en España, pasamos a describir los factores de calidad de las naranjas destinadas a la industrialización. Desde que se dictaron en España las primeras normas que regulaban la exportación de las naranjas en fresco en 1930, el interés por la valoración de su calidad ha ido en aumento. Así en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC) de Valencia, desde 1962, se han llevado a cabo a lo largo de diversas campañas una serie de trabajos de investigación sobre la calidad de las variedades de naranja (Primo y Sala, 1975, Sala *et al.*, 1971).

Las primeras normas de calidad españolas, en este sentido, para comercio exterior datan de 1930; las vigentes en la actualidad aparecen recogidas en la Orden de 21 de Septiembre de 1981 (B.O.E. del 5-10-1981) y en la Resolución de 13 de Julio de 1984 (B.O.E. del 23-7-1984). Expresan el grado de maduración interna por la relación E.S./A. del zumo, conocido como Índice de madurez (I.M.).

La normativa vigente en comercio exterior, para las naranjas, exige un I.M: de 5,5/1, o bien de 6,5/1 para las variedades tardías.

Las exigencias administrativas para las naranjas destinadas a su transformación industrial, están fijadas por la Orden de 2 de Noviembre de 1989 (B.O.E. núm. 265 del 4-11-1989). En su estipulación segunda, la citada Orden especifica las condiciones de calidad, que deben reunir los frutos entregados a la industria:

- a) Características de los frutos.
- b) Contenido mínimo de zumo y coloración.
- c) Calibres mínimos.

La calidad de la naranja para la fabricación de zumo, se mide por el contenido en zumo, los sólidos solubles (grados Brix) y el índice de madurez. El contenido en zumo, expresado como tanto por ciento respecto al peso de fruta, es uno de los valores más representativos de la calidad de la materia prima, ya que en la industria es decisivo valorar el rendimiento de una partida de naranjas por sus repercusiones económicas. Por definición el grado Brix se refiere a la unidad de peso de sacarosa contenida en 100 g de disolución acuosa. Pero el zumo cítrico es una disolución en agua de una serie de sustancias entre las que se encuentran azúcares, ácido cítrico, constituyentes minerales, glucósidos, sustancias pécticas, productos nitrogenados, grasas, vitaminas, componentes aromáticos, etc., que, en mayor o menor grado, participan activamente en el valor de grados Brix determinado por refractometría directamente en el zumo. Por su especial influencia se puede aplicar la corrección debida al ácido cítrico.

Generalmente las industrias trabajan simultáneamente naranjas de diferentes variedades y distintos orígenes con grado de maduración variable. Es frecuente realizar mezclas de zumos, procedentes de principios de temporada, conservados por congelación o en envasado



aséptico, con los zumos extraídos de frutos más maduros, para lograr la estandarización del ratio E.S./A. adecuada.

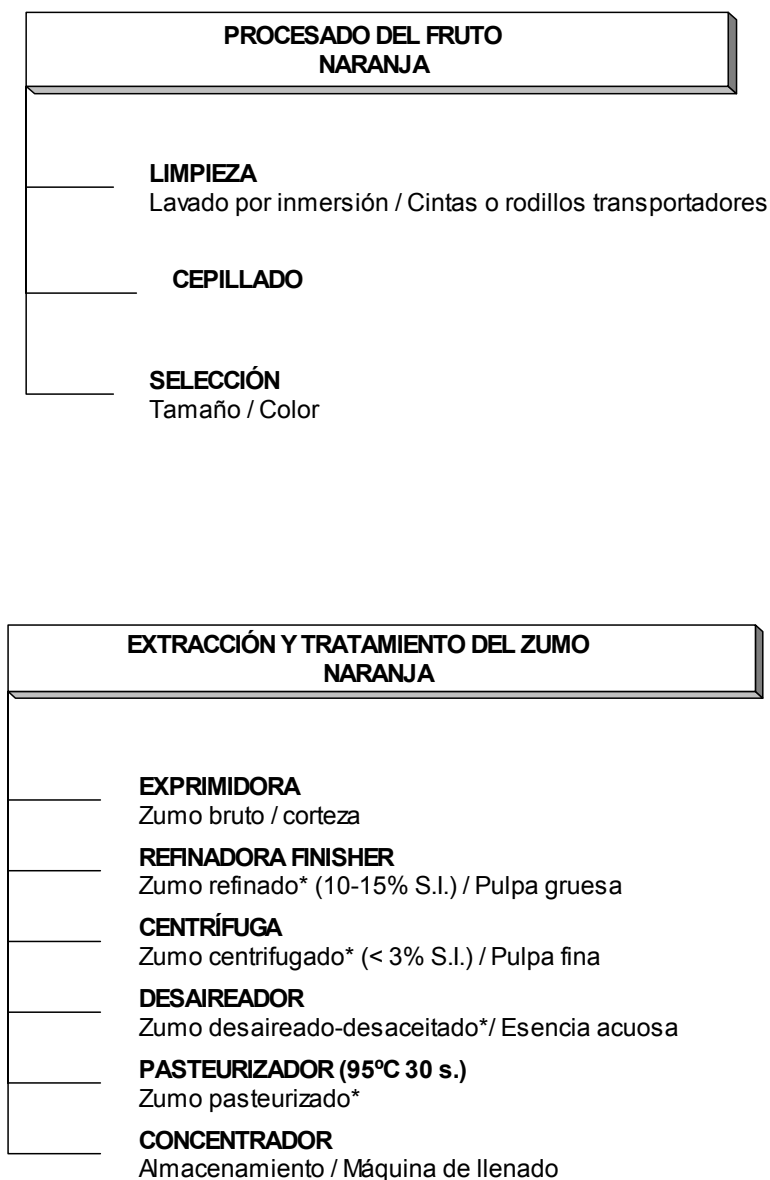
### **I.2.2.- Elaboración de zumos cítricos**

La figura I.2.2.-1. muestra un esquema de elaboración de zumos cítricos. En este proceso destaca el sistema de funcionamiento continuo y cerrado, disminuyendo así el riesgo de oxidaciones por mezcla de aire con el producto. Las modernas plantas de producción son automáticas para eliminar el factor de riesgo debido al error humano. La instalación es flexible y de diseño higiénico con sistemas de limpieza automáticos.

Las principales etapas que componen el tratamiento total se clasifican en:

- Tratamiento del fruto (lavado, cepillado e inspección).
- Extracción de zumo y aceites esenciales.
- Tratamiento del zumo propiamente dicho (despulpado, mezcla y corrección, desaireación y pasteurización).
- Concentración y enfriamiento final del producto.

Fig.1.2.-1.- ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DEL ZUMO DE NARANJA



\* Muestras seleccionadas para el análisis de constituyentes aromáticos.

### *1.2.2.1.- Tratamiento del fruto*

El primer elemento en una línea de producción es la máquina de lavado de frutas; está especialmente diseñada para sumergir y lavar a la vez los frutos antes de la extracción del zumo. La segunda parte de la máquina consiste en un elevador de rodillos inclinado que lo saca del agua. En este elevador el fruto es enjuagado con duchas de agua limpia. Inmediatamente después viene el cepillado, en parte también bajo duchas de agua, para la limpieza en la superficie del fruto de las partículas de suciedad y arrastre de residuos de tratamientos que aún queden depositados.

Finalmente se somete al control y selección mediante inspección, que se realiza sobre una mesa de rodillos transportadores giratorios para la fruta, que exponen toda la superficie del fruto a la vista de los inspectores encargados de la selección, considerando entre otros parámetros el tamaño y color de la misma.

### *1.2.2.2.- Extracción del zumo*

La extracción de un zumo cítrico ha de hacerse de forma rápida para evitar daños irreparables a la calidad y evitando que pasen al zumo elementos que producen amargor y que se encuentran en la piel, las semillas, membranas, etc.,...

Una máquina moderna de extracción consta de dos copas, una superior y otra inferior que alojan al fruto; en la parte baja de la copa inferior se encuentra un cuchillo circular que se prolonga en un cilindro de superficie agujereada o ranurada y que actúa como tamizador para separar por tamaño las fracciones internas del fruto extraídos. El cuchillo corta el vértice inferior del fruto para permitir el acceso del cilindro tamizador hacia las partes internas.

El ciclo de extracción avanza al entrecruzarse las copas, la presión sobre el fruto aumenta forzando al endocarpio a que escape por la parte inferior, pasando así al cilindro tamizador mientras la corteza es expulsada por la parte superior. El zumo y la pulpa por su menor tamaño fluyen a través de las perforaciones del tamizador pasando hacia un tubo colector, mientras las partes más groseras son forzadas a salir al exterior siendo descargadas de la máquina junto con la corteza.

Con este sistema de extracción se separa el zumo propiamente dicho con pulpa (zumo bruto o técnico) del resto de tejidos de membranas y semillas del endocarpio y de la corteza, a la vez que se reduce la incorporación de aceite esencial.

#### 1.2.2.3.- *Tratamiento del zumo*

El tratamiento del zumo incluye varias operaciones:

- Refinado del zumo, separando mediante finishers gran parte de la pulpa extraída con el zumo.
- Clarificación por decantadores centrífugos del zumo para la eliminación de pulpa fina hasta niveles del 1-3%.
- Mezcla y corrección para ajuste del producto, con objeto de conseguir unas condiciones estándar en cuanto al contenido en acidez, color,...
- Desaireación con objeto de eliminar el aire disuelto en el zumo, para evitar procesos de oxidación favorecidos en los tratamientos térmicos sucesivos del producto.
- Pasteurización instantánea para la inactivación de enzimas pectolíticas y destrucción de microorganismos.

La clarificación del zumo comienza con el paso del zumo a través de una refinadora (finisher) con tamaño de poro entre 0,6 y 0,8 mm. Se

separa de esta forma la pulpa gruesa del zumo, junto con pequeñas semillas y/o partículas arrastradas. Seguidamente el zumo pasa a una separadora centrifugadora; en este tipo de máquina el contenido final en pulpa del zumo puede ser fácilmente ajustado según los requerimientos del mercado. Esta centrifuga trabaja como clarificadora, es decir, hay un solo líquido que abandona la máquina, mientras los sólidos son retenidos en su interior y expulsados periódicamente a intervalos regulares. La corrección y mezcla del jugo se hace en tanques de acero inoxidable equipados con agitador.

La siguiente etapa es la desaireación que generalmente se efectúa en una cámara a vacío, normalmente equipada con un condensador en su parte superior para la recuperación de los aromas que tienden a escapar. El zumo es bombeado al depósito, donde entra de forma tangencial formando una fina capa. El depósito está sometido a la acción del vacío mediante una bomba mecánica de anillo hidráulico. El vacío creado es suficiente para hacer que el producto entrante rompa a hervir y los vapores y gases ascienden hasta el condensador refrigerado por agua, de forma que se produce una separación de vapores condensados que caen y se mezclan con el zumo desaireado y de gases incondensables que son extraídos por la bomba. En algunos casos los vapores condensados no se incorporan al zumo directamente, sino que son recogidos en un tanque diferente constituyendo la llamada esencia acuosa, este proceso se corresponde con el desaceitado del zumo, impidiendo de esta forma el daño térmico sufrido por los componentes volátiles durante la etapa siguiente de pasteurización. La eliminación de aire redundará en una mejor calidad del zumo ya que se evitan pérdidas de vitamina C y se limita el consiguiente pardeamiento del zumo mediante mecanismos químicos o reacciones de Maillard, además de facilitar el proceso de pasteurización del zumo.

La pasteurización es un proceso esencial para conseguir un periodo de larga vida en los zumos vegetales; en ella se consigue la

eliminación de microorganismos patógenos a base de calentar el zumo a una temperatura dada durante un tiempo determinado. Sin embargo, en el caso de los zumos de los frutos cítricos resulta más importante la inactivación de las enzimas naturalmente presentes, en especial la actividad pectinmetilesterasa (PME) responsable de la inestabilidad de la turbidez natural del zumo, debiendo alcanzar para ello condiciones de temperatura-tiempo más energéticas (hasta 98°C durante 30 s) que las necesarias para lograr la destrucción microbiana, a su bajo pH. La pasteurización puede ser realizada en varios tipos de aparatos, cambiadores tubulares, cambiadores de placa, cambiadores espirales, de tubo corrugados, etc., pero normalmente es el intercambiador de placas el más aplicado en la industria para el caso de los zumos simples. Con objeto de ahorrar energía, el pasteurizador de placas lleva una sección llamada regenerativa en la que el zumo entrante es precalentado por el zumo que sale ya pasteurizado. Una sección de enfriamiento también puede ser incorporada con objeto de obtener un zumo a temperaturas inferiores a 20°C.

#### *1.2.2.4.- Concentración y enfriamiento final del zumo*

La concentración es una etapa muy importante y que influye enormemente sobre la calidad del producto obtenido. Tiene que efectuarse a temperaturas bajas (no más de 50°C) y en breves segundos. Esto es esencial dada la alta sensibilidad al calor de los zumos de naranja. Pérdidas de componentes tan importantes como las vitaminas y daños a los aromas pueden tener lugar cuando se trabajan a temperaturas altas durante periodos largos de tiempo.

Finalmente el zumo concentrado es enfriado hasta alcanzar 1°C en otro intercambiador de placas para pasar de ahí al almacenamiento o directamente a máquinas de llenado.

### **1.2.3.-Aprovechamiento de subproductos cítricos**

La obtención de zumos cítricos lleva asociado la producción de gran cantidad de residuos, tales como cortezas, pulpas, semillas,...

El rendimiento en zumo es en el mejor de los casos del 40-50% del peso total de fruta. Dado el actual estado de la industria cítrica es muy importante sacar un beneficio económico a esos subproductos, evitando a su vez la problemática medioambiental de su eliminación.

Los subproductos más usuales son los destinados hacia: alimentación de ganado y producción de aceite de semillas, materia prima para la industria confitera, como envases para helados, concentrados bases para bebidas refrescantes (Comminuted), aislamiento de pigmentos naturales, aislamiento de diferentes productos para la industria farmacéutica (Flavonoides), producción de ácido láctico, pectinas y alcohol y por último obtención de aceites esenciales.

Se ha experimentado que partiendo de residuos cítricos, por molido, tratamientos térmicos y enzimáticos, seguido de separación de sustancias sólidas no solubles y concentración final, puede obtenerse un concentrado de buen color, de turbidez estable y buen aroma, ideal para la producción de bebidas refrescantes. Este concentrado turbioestable con una concentración de alrededor de 40°Brix, después de una conveniente dilución, carbonatación, adición de azúcar, ácido, etc., produce una excelente bebida refrescante.

## **II.-COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMOS CÍTRICOS**





## **II.1.- IMPORTANCIA DEL AROMA EN LA CALIDAD DEL ZUMO DE NARANJA INDUSTRIAL**

El aroma en los alimentos es una propiedad sensorial compleja, derivada del efecto integrado de numerosos componentes de diferente naturaleza química y a muy baja concentración.

También el concepto químico de flavor es conocido desde 1886 (Brillat-Savarin, 1986). Aunque el estímulo del sabor es importante, la parte del flavor que aprecia diferencias entre alimentos puede atribuirse ampliamente a moléculas volátiles aromáticas detectadas a nivel retronasal, cuando el alimento es introducido en la boca (Land, 1996).

Las investigaciones sobre los componentes volátiles de los cítricos tienen importancia para el conocimiento de la calidad de los mismos, su degradación durante el periodo de almacenaje, exposición en venta y senescencia; es decir el conocimiento de los componentes volátiles emanados por la fruta fresca, en el espacio de cabeza del zumo, en el aceite de la corteza, volátiles cítricos considerados como

fungicidas y volátiles producidos por patógenos de los cítricos (Norman, 1977).

En los alimentos se detectan un gran número de compuestos aromáticos volátiles, pero no todos ellos contribuyen en el flavor de los mismos. Diferentes técnicas han sido descritas para determinar que moléculas son activas a nivel del flavor (Grosch, 1993 y Acree *et al.*, 1984).

Las moléculas consideradas como activas del flavor en un alimento presentan características dispares con relación a sus propiedades físicas, comportamiento y niveles umbrales de percepción. La mayoría de ellas son activas a concentraciones de partes por millón e incluso de partes por billón, y sus niveles umbrales de percepción pueden variar de unas a otras en un factor de hasta un billón de veces (Leland, 1997).

Nursten en 1977 clasifica los alimentos en cuatro grupos en términos del conocimiento actual de los componentes volátiles:

1- Aquellos alimentos en los cuales el aroma reside en un único componente denominado compuesto con carácter-impacto. En algunos casos, tales como el berro, el compuesto de carácter-impacto cuenta prácticamente con todo el olor, pero esto no es extensible a todos los alimentos (como la banana en la que el componente de carácter-impacto es el acetato de isopentenilo, en el pomelo la nootkatona, y en el limón el citral).

2- Aquellos alimentos en los que el aroma es esencialmente debido a la actuación no de un solo compuesto, sino a una mezcla de compuestos de baja concentración. Un compuesto de carácter-impacto puede estar presente en el alimento. Como en el caso de la pera en la que el componente de carácter-impacto es el etil-2-metilbutirato.

3- Aquellos alimentos en los que el aroma puede ser reproducido razonablemente por el uso de un gran número de compuestos. La presencia de un componente con carácter-impacto es bastante improbable, caso del albaricoque, la lima, el melocotón,...

4- Aquellos compuestos en los que el aroma no puede ser reproducido siempre razonablemente por una mezcla de compuestos específicos. En ellos no ha sido descubierto un compuesto con carácter-impacto. Ejemplos de estos alimentos pueden ser la fresa y el chocolate.

Lógicamente esta clasificación se basa en los conceptos de compuesto con carácter-impacto y compuestos contribuyentes al flavor.

Una molécula para ser considerada activa sensorialmente ha de cumplir una serie de requisitos, según lo definido por Ohloff (1971 y 1990). Según este autor:

1º. - Ha de presentar una cierta presión de vapor para poder alcanzar el epitelio olfativo de la nariz humana.

2º. - Debe tener una mínima solubilidad en agua para penetrar en la capa acuosa de la membrana, así como baja polaridad (superficie activa, compuestos de elevada polaridad son menos olorosos).

3º. - Tendrá asimismo un comportamiento lipofílico para penetrar en las capas grasas de las células neuronales.

4º. - Su peso molecular ha de ser no excesivamente alto (el peso molecular más elevado de una molécula olorosa es de 294).

En los elaborados de los alimentos es bastante difícil definir como fundamentales solamente alguno de los compuestos químicos

responsables del carácter aromático. Contribuyen a las impresiones olfativas y gustativas varias categorías de compuestos clasificadas como compuestos hidroxílicos, aldehidos, cetonas, ácidos, ésteres, compuestos nitrogenados, compuestos sulfurados, heterociclos oxigenados y nitrogenados. Cada uno de estos compuestos confiere aromas característicos a los alimentos, como el etanal contribuye al sabor de la mantequilla y el hexanal al de las manzanas.

El papel de estos componentes volátiles primarios está influenciado por la naturaleza del alimento, la presencia o no de componentes no volátiles como azúcares y sustancias pécticas, ya que afectan sensiblemente y de manera compleja a la volatilidad de numerosos componentes. Un caso representativo es el del d-limoneno; su umbral de detección se duplica en presencia del ácido ascórbico y del ácido málico en concentraciones de 0,7% y 0,1% respectivamente. También cabe destacar el efecto de la reducción de la concentración en el espacio de cabeza del etanol y del acetato de etilo en sistemas en los que se adiciona un 1,1% de pectina, reducción que alcanza el 25% del valor inicial (Tateo, 1985).

El aroma junto con el sabor, está reconocido como uno de los atributos más importantes de los alimentos. Sin aroma un zumo de frutas no sería sensorialmente más que una solución azucarada, acidulada.

El zumo de naranja es uno de los de mayor consumo mundial. Su producción se destina fundamentalmente a elaborar concentrados, por evaporación, proceso durante el cual se pierden los componentes de mayor volatilidad. Por este motivo la industria cítrica ha estado siempre interesada en encontrar la forma de restituir al concentrado, en el momento de su reconstitución antes del consumo, el material aromático perdido para obtener productos de mayor calidad.

En un principio se añadía el aceite esencial de la corteza, más o menos tratado, al concentrado y aunque el aroma mejora enormemente

no tiene la fragancia del zumo natural. En Estados Unidos con la técnica del "cut-back", basada en añadir zumo fresco a un concentrado de 60 °Brix, lograron un producto más próximo al natural, aunque de menor concentración (42-45 °Brix), que conservado por congelación permitía al reconstituirlo por disolución en agua obtener un zumo natural con buenas características organolépticas.

En la actualidad, al aplicarle al zumo de naranja las técnicas de concentración con recuperación de aromas por rectificación en columna, de los vapores desprendidos durante las primeras fases de la evaporación, se obtiene una esencia aromática concentrada que se añade posteriormente al zumo, restituyéndole toda su fragancia original, mejorando y potenciando la calidad de los zumos industrializados.

Por otro lado, el gusto del consumidor se orienta hacia el aroma y sabor del zumo fresco y no de la corteza y en este sentido, los componentes aromáticos naturalmente presentes en el zumo mejoran la apetecibilidad del zumo así elaborado y que constituye la base del tan conocido como FCOJ (Frozen concentrate orange juice) del mercado estadounidense.

Por lo tanto, en el zumo de naranja industrial, la fracción volátil está constituida, por compuestos químicos presentes en diversas partes del fruto que se reúnen en el zumo durante su extracción.

La parte del fruto más importante, en el aporte cuantitativo de componentes, es la corteza que durante la extracción libera parte de su aceite esencial. Cualitativamente, el zumo obtenido después de pelar cuidadosamente la fruta y tratar con permanganato su superficie, para evitar la incorporación de aceite esencial de la corteza, presenta prácticamente los mismos componentes, que el obtenido industrialmente, aunque en menor cantidad y en proporciones diferentes (Fernández, 1995).

En el sector industrial el problema que más preocupa es la formación de compuestos aromáticos de derivación. Este fenómeno interesa también tenerlo en cuenta en la materia prima (concentración de azúcar en la fruta, extracción de la fracción aromática, preparación de los aromas) y de hecho las causas de modificación en el inicio de la producción influyen durante la misma y en el producto final. Un ejemplo clásico de degradación oxidativa que afecta a la mayor parte de los aromas en cítricos, es la derivada del d-limoneno, cuya oxidación radical conlleva la formación de  $\alpha$ -terpineol, trans-2,8-p-mentadien-1-ol, cis-2,8-p-mentadien-1-ol, carvona, trans y cis-carveol. El radical intermedio en la reacción puede provocar hidroperóxidos ópticamente activos (Moshonas y Shaw, 1990).

La experiencia demuestra que los aceites esenciales con elevado contenido en alcoholes, ésteres, fenoles, éteres, óxidos y algunas cetonas, resultan bastante estables frente aquellos en los que el contenido en aldehidos y terpenos es elevado, ya que en estos últimos las reacciones de degradación con formación de productos secundarios son más favorables. Sobre todo en el aceite esencial de limón y naranja que son muy sensibles a fenómenos oxidativos. El aceite esencial de bergamota, otro fruto cítrico, a pesar de tener una composición próxima, presenta una estabilidad mayor que puede ser debida al bajo contenido en citral y limoneno.

Los productos aromáticos secundarios más comunes son: 2,5-dimetil-4hidroxi-3-furanona, furfural, 2-hidroxiacetil-furano, 5-hidroxiacetilfurfural, 3-hidroxi-2-pirona, cis-1,8-p-mentadienol, trans-1,8-p-mentadienol,  $\alpha$ -terpineol y 4-vinilguayacol.

El  $\alpha$ -terpineol, en particular presenta un incremento cuantitativo lineal en función del tiempo de envejecimiento del zumo de naranja y se considera como indicador del tiempo de almacenamiento (Durr y Schobinger, 1981). Se han realizado estudios que demuestran que las mejores esencias son las que contienen menor cantidad de acetaldehido, butirato de etilo y octanal. Aquellas que contienen altas

concentraciones de hexanal, trans-2hexanal,  $\alpha$ -terpineol, 1-hexanol, trans-2,8-p-mentadien1-ol, y trans-carveol, son en cambio las más sujetas a degradación con formación de flavor no deseados (Askar *et al.*, 1973).

## **II.2.- COMPONENTES VOLÁTILES CARACTERÍSTICOS DEL ZUMO DE NARANJA**

El término de volátil se suele utilizar para describir las emanaciones gaseosas de las frutas intactas o los componentes presentes en los espacios de cabeza del zumo, en donde se encuentran en equilibrio los componentes volátiles con aquellos disueltos en el zumo, pero en general se refiere a los componentes que son separados por destilación o arrastre por vapor de agua del resto de la matriz del zumo con carácter fijo o no volátil.

En el estudio de los frutos cítricos, el concepto de volátil es utilizado para describir componentes separados del tejido macerado o del aceite esencial mediante diferentes métodos. Estos métodos de separación incluyen destilación, extracción con disolvente orgánico, trampas de vacío y purga con gases tales como  $N_2$  y  $CO_2$ . La mayoría de estos estudios se han realizado para el aislamiento y purificación de componentes individuales y la caracterización de los principales componentes responsables del aroma y el flavor de los frutos cítricos y productos derivados (Nurtens, 1977).

Básicamente, en la fruta madura, la pulpa y la corteza contienen la mayoría de los componentes del flavor. Además la pulpa comestible o endocarpio contiene azúcares como dextrosa, levulosa y sacarosa, junto con oxiácidos, componentes colorantes, enzimas, etc., que el jugo transporta en su extracción.



Existe una correlación entre el contenido en azúcar, color, acidez y el flavor según el estado de maduración de la fruta. El flavor usualmente desarrolla todo su aroma cuando el contenido de azúcares es máximo y el color de la piel o de la corteza adquiere su matiz brillante. Cuando la fruta comienza a sobremadurar el color se torna apagado, el azúcar almibarado y el flavor pierde sus volátiles más frescos.

Los volátiles emanados por la fruta fresca fueron estudiados por Biale y Shepherd (1939), detectando en naranjas variedad Navel, en limones y pomelos almacenados en atmósfera de nitrógeno, emanaciones grandes de acetaldehído cuando eran transferidos al aire. Attaway y Oberbacher (1968) estudiaron los compuestos que contribuyen al aroma de la naranja. Las emanaciones de los frutos fueron estudiadas durante un periodo de almacenamiento tras extracción, concentración y análisis mediante cromatografía gas-líquido y espectrometría de masas, llegando a detectar seis componentes mayoritarios (acetato de etilo, butirato de etilo, etanol, limoneno, caproato de etilo, caprilato de etilo). La presencia de etanol fue relacionada con la actuación de microorganismos durante los doce días de estudio. Acetaldehído y metanol no fueron detectados ya que su presencia pudo verse enmascarada por el disolvente éter etílico o pudo haberse perdido durante el paso de la concentración. Más tarde acetaldehído, metanol, etanol, y acetato de etilo, junto con limoneno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -mirceno, se identificaron como los componentes más abundantes que envuelven al limón de California y a las naranjas de variedad Navel y valencia (Norman (1970), Norman y Craft (1968) y Norman *et al.* (1968).

De todos los componentes identificados en la emanación de frutos cítricos solo acetaldehído, metanol, etanol y acetato de etilo han sido relacionados con la calidad de la fruta fresca (Norman, 1977).

En la corteza de naranja los componentes mayoritarios o más importantes son de naturaleza terpénica (en su mayoría monoterpenos)

y aldehidos. El componente más abundante por un largo margen y a un alto nivel para un solo elemento es el limoneno, autores como Ikeda *et al.*, (1962) han ofrecido información sobre su concentración, que oscila entre el 83 y el 79% del total de los volátiles. El linalol también aparece a una elevada concentración, siendo considerado como uno de los componentes que definen la calidad de la corteza de la naranja. También el mirceno ha sido considerado como componente habitual en la misma. Aunque el citral es un compuesto característico en el limón, es un componente minoritario de la naranja. Otro monoterpeneo carbonilo encontrado es la carvona, producto de oxidación en condiciones ácidas del limoneno, al igual que el  $\alpha$ -terpineol. Un sesquiterpeneo importante de la naranja que la diferencia del resto de los cítricos es el valenceno presente en la cera cuticular.

Los volátiles en la piel de la naranja Navel todavía sin recolectar fueron estudiados por Coggins *et al.*, (1969) durante 38 semanas, quienes detectaron que el contenido en octanol, linalol y geranial, disminuía durante la experiencia. El contenido en valenceno permanecía relativamente constante durante las primeras 22 semanas, y en el resto de la experiencia su contenido incrementó y permaneció elevado. Destacan los autores que la concentración de estos componentes del aceite esencial está relacionada con la senescencia y propusieron la posibilidad de crear un índice de senescencia con uno o más de estos compuestos. Valenceno y linalol fueron los componentes seleccionados para medir este índice, ya que la concentración del octanol fluctúa en gran medida y la del geranial es pequeña.

McLeod *et al.* (1988) estudiaron la composición de los volátiles en corteza de naranja de Libia, variedad que contiene 56.4 $\mu$ g de compuestos volátiles totales por gramo de piel de naranja, siendo un contenido normal de 30ppm. De los componentes que describen 16 son presentados por primera vez: hexil hexanoato, longifoleno,  $\gamma$ -selineno, bisaboleno, eicosano, docosano, tricosano, tetracosano,

pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano, nonacosano, 4-isopropenil-3metilenciclohexano, sabinol, 4fenil-acetofenona.

A diferencia de las naranjas variedad Navel o Valencia, en las que el limoneno es el monoterpeno mayoritario, en la corteza de la naranja de Libia únicamente ha sido encontrado en un 52%, aunque en términos absolutos esté presente sobre la misma cantidad 29  $\mu\text{g/g}$ . La razón para el bajo porcentaje de limoneno se debe a la alta concentración de linalol, 16% equivalentes a 4,7  $\mu\text{g/g}$ . Dada la concentración a la que es detectado este componente, está considerado como nivel de la buena calidad de la naranja Liberiana. En trabajos anteriores, el mirceno ha sido detectado como el segundo componente más abundante en la piel de naranja.

Aunque el citral es mayoritariamente responsable del carácter único del limón, es sólo un constituyente minoritario de la naranja, presentándose el geranial en mayor concentración que el neral. Otro monoterpeno carbonilo detectado es la carvona (1,4  $\mu\text{g/g}$ ), conocida como un producto de oxidación del limoneno, al igual que  $\alpha$ -terpineol.

De los sesquiterpenos el valenceno es uno de los más representativos, que diferencia la naranja de otros cítricos (0,2  $\mu\text{g/g}$ ). Otros sesquiterpenos hidrocarbonados que han sido reportados como constituyentes del aroma en la naranja liberiana son:  $\beta$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno, y humuleno, siendo de estos el más abundante en la corteza de la naranja el  $\beta$ -capoeno (2.5  $\mu\text{g/g}$ ).

Además de los terpenos, los componentes más importantes de la corteza son los aldehidos. Octanal, decanal y nonanal son los mayoritarios. La concentración total de aldehidos aumenta con la madurez al igual que su contenido en aceite esencial.

El jugo exprimido no contiene el sabor y el olor de la fruta intacta. Los componentes característicos aromáticos volátiles los cuales componen el olor y sabor fresco del jugo no superan las 0.07 partes por mil. El flavor tan apreciado en el zumo de naranja básicamente se debe

a la mezcla compleja de numerosos componentes volátiles que mantienen entre sí una interdependencia cuantitativa.

Esta complejidad, características físico-químicas y concentraciones variadas de los componentes responsables del flavor, hacen más difícil la identificación y cuantificación de los mismos (Moshonas y Shaw, 1995).

Los componentes mayoritarios en las frutas cítricas presentan estructuras químicas de ácidos, carbohidratos, sólidos solubles y variados compuestos volátiles del aceite esencial. Con relación a estos últimos, las más conocidas o más estudiadas son las del limón, la naranja, el pomelo, la mandarina y la bergamota. Terpenos ( $C_{10} H_{16}$ ) y en menor cantidad sesquiterpenos ( $C_{15} H_{24}$ ) son los componentes mayoritarios. Ambos componentes proceden de compuestos oxigenados como alcoholes, aldehidos, cetonas, ácidos y ésteres.

Los componentes volátiles del zumo se encuentran repartidos entre la pulpa y el suero. Estudios realizados por Radford *et al.* (1974), muestran que la pulpa de naranja tiene un efecto represivo sobre la concentración de los volátiles en el espacio de cabeza de un sistema aire-agua modelo (Tabla II.2.-1).

Los volátiles obtenidos de la pulpa y del suero fueron identificados mediante cromatografía gaseosa, destacando que en el zumo de naranja la mayoría de los hidrocarburos están asociados con la pulpa. Por otro lado, resulta obvio que los compuestos oxigenados estén más relacionados con el suero; este tipo de compuestos están considerados como los principales constituyentes del aroma del jugo de naranja.

El grado en el cual se da la distribución de cada componente depende sobre todo de la longitud de la cadena y del grupo funcional del compuesto. Por ello si los hidrocarburos están ausentes del jugo, la eliminación de la pulpa por centrifugación conducirá hacia menores pérdidas de volátiles, lo que facilita el aislamiento de los volátiles del

flavor y al mismo tiempo reduce la tendencia al pardeamiento no enzimático que ocurre durante el procesado del zumo.

El estudio de la composición de componentes volátiles en el zumo fresco de naranja ha sido llevado a cabo por numerosos investigadores, entre los que se encuentran Schreier *et al.* (1977 y 1979), Schreider (1981), Sauri *et al.* (1980), Rodríguez y Culbertson (1983), Shaw (1991), Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), Lum *et al.* (1990), Park y Venables (1991) y Moshonas y Shaw (1987 y 1994).

Investigadores como Pino (1982), Rodríguez y Culberston (1983), cuantifican hasta siete y ocho componentes respectivamente en el zumo fresco de naranja, estudios más recientes de Moshonas y Shaw (1987), llevaron a la cuantificación de 24 componentes.

Estas investigaciones han permitido el conocimiento de la mayoría de los componentes del flavor, pero la metodología empleada en la determinación de los mismos conduce a resultados parciales; la extracción con disolvente orgánico seguida de la eliminación del mismo por evaporación y el consiguiente análisis cromatográfico,

**Tabla II.2.-1. DISTRIBUCIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL FLAVOR EN EL ZUMO DE NARANJA**

Componentes	% de Distribución	
	Pulpa	Suero
<b>Pentanal</b>	0,0	100,0
<b>Hexanal</b>	0,0	100,0
<b>Heptanal</b>	0,0	100,0
<b>Octanal</b>	16,8	83,2
<b>Nonanal</b>	42,7	57,3
<b>Decanal</b>	78,0	22,0
<b>Butanoato de etilo</b>	2,1	97,9

<b>Pentanoato de etilo</b>	3,6	96,4
<b>Hexanoato de etilo</b>	9,9	90,1
<b>Heptanoato de etilo</b>	32,0	68,0
<b>Octanoato de etilo</b>	65,3	34,7
<b>Decanoato de etilo</b>	82,3	17,7
<b>1-Pentanol</b>	2,0	98,0
<b>1-Hexanol</b>	2,6	97,4
<b>1-Heptanol</b>	5,5	94,5
<b>1-Octanol</b>	17,2	82,8
<b>1-Nonanol</b>	44,8	55,2
<b>1-Decanol</b>	75,0	25,0
<b><math>\gamma</math>-Valerolactona</b>	1,9	98,1
<b><math>\gamma</math>-Hexalactona</b>	3,2	96,8
<b><math>\gamma</math>-Heptalactona</b>	2,3	97,7
<b><math>\gamma</math>-Octalactona</b>	3,6	96,4
<b><math>\gamma</math>-Nonalactona</b>	6,3	93,7
<b><math>\gamma</math>-Decalactona</b>	12,7	87,3

Radford *et al.*, 1974.

supone diferentes pérdidas a nivel cuantitativo para cada uno de los componentes volátiles determinados (Moshonas y Shaw, 1995).

El aislamiento de los componentes volátiles mediante la extracción de un volumen de aire del espacio libre sobre el zumo, seguido de una inyección directa en un cromatógrafo de gases, quizá sea el más representativo de los análisis de la composición de la fracción volátil (Alberola e Izquierdo, 1978).

Los volátiles en el espacio de cabeza de los zumos de naranja Navel y valencia han sido estudiados por Schultz *et al.* en 1971. El resultado del análisis rindió suficiente material para identificar 29 componentes de los 72 detectados. Acetaldehído, etanol,  $\alpha$ -pineno, mirceno y limoneno fueron los componentes mayoritarios encontrados

en el espacio de cabeza, siendo el limoneno el que se encuentra en proporción más elevada.

Autores como Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), Lizotte y Shaw (1992), Shaw *et al.* (1993), analizaron mediante la técnica de espacio de cabeza estático muestras de zumo de naranja fresco, detectando entre 19 y 22 componentes volátiles.

A pesar de que el uso de esta técnica elimina las pérdidas ocasionadas mediante los métodos de extracción, el escaso volumen de muestra que puede ser inyectado en el cromatógrafo de gases únicamente permite la cuantificación de un número escaso de componentes. Moshonas y Shaw en 1994 y 1995, emplean la cromatografía de gases acoplada a un sistema de inyección de espacio de cabeza dinámico, para analizar los componentes volátiles presentes en zumo de naranja fresco, llegando a identificar 49 componentes de los que 46 fueron cuantificados (Tabla II.2.-2).

Tabla II.2.-2. **COMPONENTES VOLÁTILES IDENTIFICADOS Y CUANTIFICADOS (ppm) EN ZUMO DE NARANJA FRESCO.**

COMPONENTES	VALENCIA		
	EXPRIMIDO MÁQUINA	EXPRIMIDO A MANO	
Metanol	60	126	37
Etanol	660	1230	1150
1-Propanol	0,21	0,44	0,31
Acetato de etilo	0,15	0,25	0,28
2-metil-3-buten-2-ol	0,18	0,34	0,40
2-Metilpropanol	0,010	0,087	0,048
Butanol	0,006	0,069	0,019
1-Penten-3-ol	0,12	0,037	0,037
1-Penten-3-ona	0,054	0,024	0,013
2-Pentanol	0,46	0,30	0,037
Propionato de etilo	0,0038	0,012	0,008
Butanoato de metilo	0,006	0,0033	0,016
3-Metil 1-butanol	0,014	0,39	0,17
2-Metil-1-butanol	0,001	0,053	0,025
1-Pentanol	0,093	0,055	0,013
3-Metil-2-buten-1-ol	tr	0,033	0,0074
Butanoato de etilo	0,83	1,53	0,84
(E)-2-Hexenal	0,01	0,037	0,041
(Z)-3-Hexen-1-ol	0,31	0,27	0,17
Hexanol	0,20	0,16	0,12
Heptanal	0,0038	0,0029	tr
$\alpha$ -Pino	0,57	0,94	0,10
Sabineno	0,15	0,039	0,023
Mirceno	0,76	3,3	0,34
Hexanoato de etilo	0,047	0,13	0,16
Octanal	0,18	0,59	0,004



<b><math>\alpha</math>-Felandreno</b>	0,021	0,024	0,009
<b><math>\delta</math>-3-Careno</b>	0,010	0,038	0,002
<b>Limoneno</b>	76	134	18
<b><math>\beta</math>-Ocimeno</b>	0,025	0,072	0,018
<b><math>\gamma</math>-Terpineno</b>	0,01	0,01	0,002
<b>Octanol</b>	0,13	0,37	0,089
<b>(Z)-Oxido de Linalol</b>	0,048	0,11	N.D.
<b>(E)-Oxido de Linalol</b>	0,081	0,14	0,022
<b>Linalol</b>	0,75	0,92	0,13
<b>Nonanal</b>	0,022	0,082	0,001
<b>Etil-3-hidroxi-hexanoato</b>	0,27	0,49	0,28
<b>Octanoato de etilo</b>	0,035	0,023	0,031
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,11	0,20	N.D.
<b>Decanal</b>	0,16	0,45	0,016
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	0,19	0,91	N.D.
<b>Neral</b>	0,0005	0,028	tr
<b>Carvona</b>	0,058	0,11	0,004
<b>Geranial</b>	0,0005	0,035	tr
<b>Perialdehído</b>	0,034	0,097	0,012
<b>Valenceno</b>	2,1	4,4	3,3

tr: Componentes detectados a nivel de trazas. N.D.: No detectado.  
(Moshonas y Shaw, 1995).

### **II.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS DE EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES.**

La mayoría de los componentes volátiles están presentes en los alimentos sólo en pequeñas cantidades, así como en la fase vapor en equilibrio con el mismo, en la que la concentración de los constituyentes volátiles más importantes puede variar desde  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  mg/L, frente a los denominados componentes traza cuya concentración incluso queda por debajo de  $10^{-7}$  mg/L. Tales concentraciones parecen sugerir que muchos de estos componentes no resulten importantes en su aportación al olor del alimento y que no producirán una estimulación sensorial. No obstante se han llegado a determinar valores umbrales de detección tan bajas como  $10^{-9}$  mg/L en el caso de la vainillina (van Gemert y Nettembreiger, 1977).

El estudio de la fracción volátil en los alimentos según Alberola e Izquierdo (1978) requiere cuatro etapas definitorias:

- 1<sup>a</sup>.- Separación de la fracción volátil de la materia no volátil.
- 2<sup>a</sup>.- Concentración de la fracción volátil.
- 3<sup>a</sup>.- Separación de los constituyentes de la fracción aromática.
- 4<sup>a</sup>.- Identificación de los mismos.

Entre los distintos métodos se pueden distinguir principalmente entre los que se dirigen a la recuperación de los “componentes volátiles totales” presentes en el alimento y las técnicas que se basan en el estudio del denominado “espacio de cabeza”, correspondiente a los vapores que, procedentes del alimento, se encuentran en su entorno. Desde las primitivas técnicas de destilación o extracción con disolventes, nuevos métodos se han venido desarrollando para recuperar los compuestos de interés, intentando no producir alteraciones de los mismos ni introducir contaminantes o desarrollar artefactos que puedan interferir en el posterior análisis. No obstante,

técnicas diferentes aplicadas a una misma muestra conducen inevitablemente a la obtención de distintos resultados, aportando una información diferente sobre la identidad y la cantidad de los componentes volátiles presentes en el alimento. Es considerando esta variedad de métodos y la diversidad de resultados donde se debe encuadrar la aplicación más adecuada en cada caso para que resulte lo más representativo de la composición en la muestra en estudio.

Muy diferentes técnicas han sido desarrolladas para el aislamiento de los volátiles a partir del alimento matriz (Bemelmans, 1979; Gómez *et al.*, 1992; Marsili, 1997; Schreier e Idstein, 1985; Schreier, 1987; Teranishi *et al.*, 1971; Weurman, 1969; Mariaca y Bosset, 1997), obteniendo diferentes resultados debido a la mayor o menor efectividad del método en la recuperación del extracto aromático final.

Los métodos de determinación analítica pueden agruparse en dos categorías.

A) Análisis de componentes volátiles totales. Destilación del zumo y extracción del destilado con disolvente orgánico o extracción directa del zumo con disolvente orgánico.

B) Análisis del espacio de cabeza, es decir análisis de la composición del vapor sobre el zumo.

La primera está basada en la volatilidad del componente e incluye varios procesos de destilación para separar de la matriz del alimento componentes volátiles de aquellos que no lo son. El otro método se basa en el coeficiente de distribución favorable del componente entre un extractante y el alimento. Numerosos procedimientos han sido implantados utilizando estos dos principios.

La determinación cuantitativa de los componentes que aparecen en el ámbito de trazas resulta difícil. Las técnicas empleadas para el aislamiento y la cuantificación de volátiles suponen una alteración en

las relaciones cuantitativas de los componentes individuales. El uso de la inyección directa del zumo en un cromatógrafo de gases ha sido desechado dado que azúcares y otros compuestos de elevado punto de ebullición llegan a descomponerse en el inyector y oscurecen el cromatograma.

### **II.3.1.- Análisis de componentes volátiles**

La elección del método apropiado depende de las características físico-químicas de los componentes volátiles de interés, de cual sea su concentración en el producto, rango de punto de ebullición y polaridad, especialmente.

Existen diferentes factores que hacen complicada la preparación de la muestra, según lo expresado por Parliment (1986):

1.- Nivel de concentración. La concentración de los compuestos aromáticos es generalmente baja del orden de ppm, ppb y ppt, por lo que no es solamente necesario aislar los componentes sino que han de concentrarse en un alto nivel.

2.- La matriz: Los componentes aromáticos, en su mayoría se encuentran a nivel celular, asociados con componentes no volátiles como lípidos, proteínas y carbohidratos, los cuales complican el proceso de aislamiento. Estos compuestos también pueden crear problemas por la formación de espumas y emulsiones y dan lugar a la aparición de contaminantes a nivel del sistema de inyección en cromatografía de gases.

3.- La complejidad de los aromas. La composición aromática de los alimentos resulta en general bastante compleja; a esto se le suma el hecho de que cada componente tiene características físico-químicas diferentes tales como polaridad, solubilidad y pH.

4.- Variación de volatilidad. Los componentes aromáticos poseen diferente volatilidad, variando desde aquellos que tienen un punto de ebullición por debajo de la temperatura ambiente a los que se encuentran en estado sólido en las mismas condiciones.

5.- Inestabilidad. Muchos componentes aromáticos son inestables y pueden ser fácilmente oxidados por el aire, o degradados por el calor o pH extremos.

Por todo ello la elección del método apropiado dependerá de las características físico-químicas de los componentes volátiles de interés, de cual sea su concentración en el producto, el rango de puntos de ebullición y polaridades.

#### II.3.1.1.- *Inyección directa de la muestra en cromatografía de gases*

La inyección directa resulta una técnica bastante conveniente en el análisis de aceites esenciales o en el que las muestras hayan de ser diluidas con un disolvente para obtener respuestas dentro de los límites del detector.

También puede utilizarse en el análisis de muestras acuosas concentradas. En la industria alimentaria a menudo durante el procesamiento la materia prima está disponible en estado acuoso; en este caso la muestra puede ser inyectada directamente si se encuentra suficientemente concentrada, ya que el problema se plantea con la vaporización del agua en el interior del sistema de inyección (1 $\mu$ l de agua se transforma en 1000  $\mu$ l en estado vapor), el volumen final resulta mucho mayor que el volumen del sistema de inyección. Además, a nivel de columna, las fases estacionarias líquidas polares, como es el caso de las de Carbowax, pueden llegar a degradarse en presencia del vapor de agua, sobre todo si no son fases fijas ligadas.

A su vez, si la muestra posee materia en suspensión como carbohidratos y proteínas se ocasionan problemas adicionales, ya que los componentes no volátiles se descomponen dejando residuos en el inyector y en la cabeza de la columna (Parliment, 1997). En el caso de los zumos de naranja esta técnica no ha sido desarrollada.

### II.3.1.2.- *Extracción directa con disolvente en muestras acuosas*

La extracción actuando directamente sobre los alimentos es utilizada para aislar los componentes volátiles o para recuperarlos de destilados acuosos. El método está basado en el coeficiente de distribución favorable de volátiles entre el disolvente y el alimento o el destilado acuoso.

Los disolventes utilizados para el estudio de los aromas han sido listados por Weurman en 1969 y revisados por Teranishi *et al.* en 1971.

La elección del disolvente es un factor importante a tener en cuenta según lo expresado por Leahy y Reineccius (1984). Si se estudian todos los componentes volátiles presentes en el alimento el disolvente utilizado no ha de ser selectivo, pero normalmente el análisis no concierne a todos ellos, por lo que ha de emplearse un disolvente selectivo y a ser posible capaz de excluir a aquellos compuestos que no deseamos determinar y que pueden interferir en el posterior análisis (Bemelmans, 1979).

Disolventes de elevado punto de ebullición, tales como el aceite de parafina y glicerol recomendados por Weurman en 1969 para el estudio de componentes de bajo punto de ebullición, prácticamente no han sido utilizados, probablemente debido a las dificultades encontradas en su purificación.

Pino *et al.* en 1981 realizan la extracción e identificación de volátiles en zumo de naranja mediante separación química y cromatografía en sílica gel, consiguiendo el aislamiento de

hidrocarburos y compuestos oxigenados. Emplean sulfito sódico para la separación de aldehidos  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados, bisulfito sódico en la separación de aldehidos alifáticos y metil cetonas. El extracto aromático libre de compuestos carbonílicos es tratado con propilenglicol y tetracloruro de carbono para la separación de alcoholes y por último en la determinación de los ésteres emplean cromatografía para eluir con éter etílico. La identificación se realiza mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Estos autores proponen como muy favorable la separación química de los componentes aromáticos, ya que las fracciones aisladas se caracterizan por su grupo funcional facilitando la identificación.

Sauri *et al.* (1988) estudian el aislamiento de volátiles del zumo de naranja por extracción con disolvente y por arrastre con nitrógeno y posterior análisis mediante cromatografía de gases. Emplean la extracción directa a partir del zumo con disolvente de bajo punto de ebullición (diclorometano) y extracción por arrastre con nitrógeno y posterior retención de los constituyentes extraídos en una pequeña cantidad de disolvente de punto de ebullición alto (dimetilformamida). Como resultado de la experiencia destacan que la extracción continua con diclorometano da lugar a rendimientos de extracción generalmente elevados, por lo que puede considerarse como una alternativa viable a la destilación a vacío y extracción posterior del destilado. A su vez el arrastre con nitrógeno y retención en dimetilformamida permite la cuantificación de componentes de punto de ebullición muy bajo, que no son cuantificables cuando se emplea el diclorometano, pues se pierden al eliminar este, o quedan enmascarados por su pico cromatográfico.

La aplicación de resinas apolares para la extracción directa de componentes aromáticos en frutas cítricas fue empleada por Di Cesare *et al.*, en 1990. El análisis se realizó mediante la aplicación de poliestireno-polivinilbenceno reticulada, resina de carácter apolar, para la extracción directa de los componentes aromáticos en zumos de

frutas. Una operación previa a la extracción fue la despectinización enzimática del zumo y su paso a través de una columna empaquetada con resina Kastel S 112, tras su posterior elución con una cantidad mínima de disolvente. La identificación de componentes mediante análisis de cromatografía gaseosa/espectrometría de masas demuestra que el método de extracción directa rinde un concentrado de alta calidad aromática, pudiendo ser utilizado antes de la etapa de concentración de zumos de frutas para evitar la pérdida de calidad en el aroma.

En la actualidad, los fluidos supercríticos son empleados como técnica de extracción con disolvente, en la extracción de alcohol y aromas en disoluciones acuosas (Mchugh y Krukonis, 1986), (Bruner, 1994).

Schultz y Randall en 1970 utilizan dióxido de carbono como agente extractante, este compuesto ha demostrado tener propiedades similares al éter dietílico, siendo particularmente efectivo en la separación de ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas.

También ha sido descrito un método para la extracción con diclorodifluorometano, disolvente de bajo punto de ebullición (-29°C), este no ha sido utilizado de manera extensiva, probablemente porque la extracción requiere elevadas presiones.

En el estudio de alimentos, el dióxido de carbono es el disolvente supercrítico más utilizado, opera a bajas temperaturas y no ocasiona degradaciones térmicas en los alimentos, es un producto no tóxico ni caro comparado con los hidrocarburos alternativos que normalmente se emplean en la extracción con disolvente (Medina y Martínez, 1997).

La extracción con dióxido de carbono como fluido supercrítico es una técnica bastante efectiva en la producción de flavor y fragancias a partir de materia vegetal, sin embargo no es conocida la influencia de algunos parámetros de operación sobre la extracción. Tal es el caso del tiempo de extracción, ya que en la determinación de la composición de



un extracto si los compuestos tienen naturalezas distintas, también presentarán diferentes coeficientes de difusión sobre el fluido supercrítico. Así compuestos de bajo peso molecular y escasa polaridad son más fácilmente extraídos que aquellos que presentan elevados tiempos de difusión sobre el fluido supercrítico (Reverchon *et al.*, 1995).

#### II.3.1.3.- *Destilación de la muestra seguida de extracción con disolvente.*

Una de las técnicas más comunes, en la preparación de la muestra para la extracción de componentes volátiles, es la destilación a vapor seguida de la extracción con disolvente orgánico. La principal ventaja que ofrece es la separación de componentes volátiles de aquellos que no lo son en la fase de destilación; otra ventaja es la simplicidad de la operación, el uso de sistemas no complicados, reproducibilidad, rapidez y la amplia gama de compuestos que pueden ser analizados. La destilación a vapor es óptima para compuestos que tienen ligera volatilidad y no son solubles en agua. También es adecuada para la extracción de componentes con punto de ebullición por debajo de 100°C (Parliment, 1997).

La muestra se emplaza dispersa en agua en un matraz redondo y mediante el calentamiento directo del mismo se consiguen extraer los componentes en fase vapor. La destilación a vapor para la extracción de componentes volátiles es utilizada desde 1960, y dependiendo del pH del medio alrededor del 30-90% de algunos terpenos, alcoholes y ésteres son perdidos durante la destilación a vapor a la presión atmosférica a la vez que aparecen diferentes productos por reacciones de degradación.

Similares efectos han sido detectados por Azzouz *et al.* (1976), quienes compararon la composición del aceite esencial de lima

destilado e inyectado en cromatografía gaseosa con la del aceite directamente inyectado en un cromatógrafo de gases. Estos autores destacan que terpenos como el  $\alpha$ -tuyeno, y aldehídos como neral y geranial se pierden totalmente durante la destilación frente a la aparición de otros compuestos como el  $\alpha$ -felandreno y  $\alpha$  y  $\beta$ -terpineol, componentes formados durante el proceso de la destilación.

Para evitar estos problemas de excesivo calentamiento de la muestra, la destilación puede ser llevada a cabo en condiciones de alto vacío.

En estos casos trampas de frío han de situarse entre el matraz de destilación y la bomba, para impedir la pérdida de componentes volátiles y el paso de vapor de agua hacia esta última.

Moshonas y Shaw (1984), utilizan este sistema para minimizar la preparación de la muestra (destilación a vacío), pero permitiendo la extracción con disolvente. Para disminuir la probabilidad de los cambios térmicos acaecidos con el empleo de elevadas temperaturas, estos autores realizan la destilación a temperatura inferior a 60°C.

Marsili *et al.* (1986), previamente a la extracción utilizan etanol para precipitar proteínas y otros componentes que causan emulsión durante la destilación. La técnica de cuantificación empleada por estos autores incluye el factor de respuesta del estándar interno. Este método es más simple y rápido que el anteriormente citado de Moshonas y Shaw, y es apto para la cuantificación de componentes del aceite esencial de la piel de la naranja de elevado peso molecular presente en el zumo. Puede ser válido para la determinación de las pérdidas por concentración de componentes del flavor deseables y la presencia de componentes indeseables por la oxidación del limoneno que ocurren durante el procesamiento y el almacenamiento de los productos.

Un sistema de destilación en condiciones de baja temperatura y presión fue diseñado por Moshonas y Shaw en 1987. La conexión del

matraz conteniendo el zumo a un sistema de refrigeración equipado con un condensador de agua fría, dos trampas de nitrógeno líquido en serie y la aplicación de vacío permitieron la identificación, por inyección directa del destilado en un cromatógrafo de gases, de 24 componentes presentes en el zumo de naranja fresco.

Moshonas y Shaw en (1987) realizan análisis cualitativos de los constituyentes del flavor en zumo fresco y concentrado. El método analítico empleado supera los problemas causados por los componentes responsables del flavor y de muy baja concentración.

A su vez, un panel de expertos catadores no determinó diferencias entre el aroma del zumo fresco, el concentrado y el del destilado a baja temperatura y presión reducida. Estos resultados informan que no existen cambios apreciables o pérdidas de volátiles durante el proceso de separación. El aroma del destilado resultó, no obstante, distinto del aroma del zumo concentrado enlatado o del jugo reconstituido a partir del concentrado de naranja.

Tras la condensación de los vapores, los componentes a identificar han de ser extraídos de la matriz acuosa; cualquier técnica de extracción descrita en la sección anterior puede ser aplicada. La extracción con disolventes orgánicos presenta el problema de la cantidad de disolvente utilizado, que ha de ser posteriormente eliminado y ocasiona pérdidas en componentes volátiles, además de quedar en el residuo los aromas con impurezas del extractante a niveles de concentración que interfieren en los análisis cromatográficos (Núñez, 1988).

#### II.3.1.4.- *Destilación-Extracción simultánea.*

Lickens y Nickerson (1964), diseñan un equipo para la extracción-destilación simultánea (SDE). En este aparato un concentrado acuoso del producto se introduce en un matraz conectado a un sistema de

refrigeración, frente a él, otro matraz es conectado al mismo sistema pero conteniendo el disolvente.

Los matraces se calientan separadamente y los vapores de agua y de disolvente condensan juntos en la sección central de refrigeración. Consecuentemente, las fases de agua y disolvente inmiscibles, quedan separadas en la sección en forma de U, recirculando cada fase a su respectivo matraz. El resultado es una destilación continua que sólo requiere un pequeño volumen de disolvente para la extracción de muestras incluso de cierto tamaño. Originalmente este equipo fue utilizado para el estudio de los componentes del aceite en lúpulo de cerveza.

En 1970, Maarse y Kepner introdujeron una modificación al sistema, aplicando una trampa de vacío para evitar la prematura condensación del vapor y un condensador de hielo seco para evitar las pérdidas del disolvente. Seguidamente, en 1974, Römer y Renner aplican un generador de vapor externo al equipo original.

El sistema diseñado por Lickens-Nickerson (1964), usualmente trabajaba a presión atmosférica, lo cual implica que el producto queda sometido a elevadas temperaturas y esto conduce a la degradación y aparición de componentes extraños. Para minimizar este hecho, el sistema fue empleado por Buttery *et al.* (1976) a presión reducida en el aislamiento de volátiles en papaya.

Estudios realizados por Jennings *et al.* (1977) sobre el empleo de diferentes técnicas para la preparación de la muestra, incluyendo el atrapamiento sobre polímeros porosos y la destilación-extracción simultánea, les llevó a la conclusión de que ninguna técnica conducía hacia resultados que reprodujesen la muestra original; no obstante, con el sistema de destilación-extracción los resultados eran más próximos a los reales.

Godefroot *et al.* (1981) propusieron un micro SDE, este sistema permite la operación con un pequeño volumen de disolvente sin tener

que ser requerido una concentración del extracto por evaporación del disolvente. La recuperación alcanzada oscila entre el 80-100% para compuestos tales como alcoholes, cetonas y plaguicidas clorados tras una hora de procesado. Esta configuración ha sido utilizada en diferentes investigaciones principalmente descritas para revisiones de flavor en alimentos.

Núñez y Bemelmans (1984) estudiaron cuatro técnicas diferentes de preparación de muestras para aislar componentes del flavor en zumo de pomelo mediante cromatografía gaseosa: -destilación vapor-vacio; extracción líquido-líquido; extracción continua líquido-líquido; destilación-extracción simultanea con solvente (SDE). Por comparación con el número de picos del cromatograma y por la evaluación del olor del extracto, estos autores destacan que el SDE para aislar volátiles en el zumo de pomelo es el más eficiente.

Green y Payne en 1989 realizan un estudio comparativo sobre la reproducibilidad del SDE empleando dos sistemas distintos de destilación, diseñados por Godefroot *et al.*(1981) y Schultz *et al.* (1977). El ensayo se llevó a cabo mediante la inyección directa de los destilados en un cromatógrafo de gases, comparando los valores de las áreas de los picos obtenidos para cada componente. En este estudio se encontró una relación de áreas de 83:100 entre el sistema de Schultz y el de Godefroot; esta diferencia de resultados se atribuye a que en el sistema diseñado por Schultz la condensación de vapores y de los componentes volátiles que continúan codestilandose ocurre antes de que los mismos puedan alcanzar la cámara de mezcla. Destacan finalmente que ambas técnicas son reproducibles y que las diferencias a nivel cuantitativo estadísticamente no son significativas.

En 1981, Godefroot describe un sistema micro de SDE, en el que las operaciones requieren un volúmen muy pequeño de disolvente, que evita la posterior evaporación del mismo para la concentración de la muestra.

A su vez, Blanch *et al.* (1993) modifican este sistema de micro extracción-destilación simultánea, aportando una ampliación de la superficie de condensación para prevenir las posibles pérdidas de los componentes de elevada volatilidad, obteniendo así una excelente eficiencia de recuperación de los compuestos analizados en el rango de mg/L y  $\mu\text{g/L}$ . Además sitúan los conductos de conexión entre los matraces de la muestra y del disolvente con la cámara de mezcla a la misma altura, permitiendo de esta manera el uso indistinto de disolventes de mayor o menor densidad que el agua, hecho que hasta el momento no podía ser efectuado como consecuencia de que en los sistemas anteriores la calidad de la extracción está relacionada con la optimización de la distancia entre la interfase agua/disolvente orgánico y los puntos de salida de los conductos de reflujo hacia su respectivo matraz, reguladas por la densidad de ambas fases. La igualdad de las presiones hidrostáticas en la interfase a una altura adecuada de las salidas de los reflujo impide el paso de cualquiera de las fases hacia el matraz contrario (Rijks *et al.*, 1983).

#### II.3.1.5.- *Concentración de los componentes volátiles*

La destilación de los componentes volátiles en los alimentos conlleva a menudo la obtención de disoluciones acuosas muy diluidas. Antes de ser inyectados en el cromatógrafo de gases, los volátiles han de ser concentrados por una de las siguientes técnicas: destilación, concentración por frío, refinamiento, adsorción ó extracción.

Frecuentemente disoluciones orgánicas diluidas son también obtenidas durante la preparación de concentrados de aromas y los volátiles han de ser concentrados por destilación antes del análisis.

La concentración por destilación fraccionada, fue estudiada por Junk *et al* (1974), quienes concentraron una disolución etérea con

compuestos de elevado punto de ebullición con una recuperación de casi el 100% del soluto empleado.

Estos pasos de extracción y concentración pueden provocar variaciones en las relaciones cuantitativas entre volátiles (Moshonas y Shaw, 1987), y acreditan una abundante información cualitativa sobre los componentes individuales pero no sobre el componente o los componentes que han sido identificados como responsables del flavor característico de los frutos.

El primer proceso comercial para la recuperación de aromas fue desarrollado para el zumo de manzana en el Eastern Regional Laboratory del Departamento de Agricultura americano en 1944, y fue denominado como proceso de recuperación de esencia (essence). El proceso fue modificado posteriormente para la extracción de volátiles de otros concentrados de frutas. Las soluciones aromáticas son usualmente extraídas del zumo de frutas durante las primeras etapas de evaporación y pueden ser adicionadas al producto final (Johnson y Vora, 1983).

Autores como Parliment (1997), emplean para la concentración del destilado acuoso u orgánico el sistema de destilación-rectificación, empleando para ello un baño termostático y una columna Vigrex. Mediante este sistema se consigue un destilado rico en los componentes de mayor volatilidad.

Pero todos estos métodos tradicionales de concentración del zumo durante el procesamiento suponen la aplicación de elevadas temperaturas o elevados vacíos, lo que supone pérdidas de los componentes aromáticos que repercuten en la calidad final del aroma del jugo procesado.

Un procedimiento para la concentración y fraccionamiento químico de aromas fue desarrollado por Parliment (1981). La fracción acuosa aromática se hace pasar a través de una columna cromatográfica con fase estacionaria  $C_{18}$  –fase reversa y la desorción

se lleva a cabo mediante la aplicación de un gradiente (H<sub>2</sub>O/disolvente orgánico). El siguiente paso de identificación de los componentes extraídos se realiza mediante cromatografía gaseosa.

Kane *et al.* (1995), proponen la concentración del aroma del jugo del limón mediante la aplicación de ósmosis inversa. Esta técnica presenta un potencial para concentrar aromas sin necesidad de tratamiento térmico. La ósmosis inversa es un proceso en contracorriente en el cual los componentes de un fluido se separan a través de una membrana polimérica semipermeable mediante un gradiente de presión (Paulson *et al.*, 1985).

En el trabajo de Kane *et al.* se estudia la evolución de la concentración en el zumo del etanol como indicador del nivel de separación durante el proceso de concentración por ósmosis inversa. La disolución se concentra desde 12.2 % hasta 23.4% en etanol. El balance de masa determinado de la recuperación de volátiles fue del 79,7%. Las pérdidas de volátiles estuvieron asociadas con la adsorción en la matriz polimérica de la membrana y algunas pérdidas fueron atribuidas a la limpieza.

### **II.3.2.- Determinación de componentes volátiles en espacio de cabeza.**

El aislamiento de volátiles mediante la extracción de un volumen de aire del espacio libre sobre un recipiente, seguido de una inyección directa en un cromatógrafo de gases, quizá sea el más representativo de los análisis de la composición de la fracción volátil (Alberola e Izquierdo, 1978), ya que contiene los volátiles que son responsables del olor, en las concentraciones y relaciones en las que son percibidas por la nariz humana.



La primera aplicación de esta técnica en la determinación de volátiles en zumos cítricos fue realizada por Wolford *et al.* (1963). El análisis del espacio de cabeza mediante cromatografía gaseosa de tres muestras de zumo de naranja procedente de tres cultivares distintos, dio como resultados cromatogramas cualitativamente iguales observándose pequeñas diferencias cuantitativas, lo cual conduce a pensar que esta técnica puede ser utilizada en la diferenciación de zumos procedentes de diferentes cultivos.

Esta técnica ha sido utilizada por un gran número de autores con el objeto de obtener cromatogramas de los componentes volátiles emanados de los alimentos y recomendada por los miembros del grupo sobre métodos de análisis de la IOFI (International Organization of the Flavour Industry).

El cromatograma así obtenido recibe el nombre de aromagrama, (Teranishi y Buttery, 1962), presentando numerosas ventajas tales como la reducción de la manipulación de la muestra y la no introducción de componentes indeseados por uso de disolvente.

Mediante esta técnica el volumen extraído del espacio de cabeza es arrastrado con un gas inerte hacia una trampa de frío, la cual puede formar parte de un sistema cromatográfico (Schultz *et al.*, 1971).

Esta técnica presenta la desventaja de que el vapor de agua es el componente mayoritario recuperado (Tress y Jennings, 1972). Por esta razón se incorpora más tarde el empleo de materiales adsorbentes. El primer adsorbente utilizado fue el carbón activo (Clark y Gonin 1975).

Lund y Dinsmore (1978) destacan que la inyección directa de los gases del espacio de cabeza del zumo de naranja en un cromatógrafo de gases, únicamente puede ser empleada para el caso de los volátiles más concentrados como en el caso de metanol, etanol, acetaldehído y limoneno.

Por todo ello, la determinación de los volátiles en el espacio de cabeza ha sido empleada con una extensión limitada, pero los resultados pueden ser extrapolados para determinar la cantidad de

cada componente individual en el zumo de naranja (Rodríguez y Culberston, 1983 y Marsili, 1986).

En la actualidad las técnicas descritas en espacio de cabeza pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Espacio de cabeza estático,
- Espacio de cabeza dinámico o de purga y trampa.

En los dos casos el principio fundamental es el mismo, los componentes volátiles de una muestra sólida o líquida se analizan mediante el estudio de la atmósfera adyacente a la muestra que queremos analizar (Wampler, 1997).

#### II.3.2.1.- *Espacio de cabeza estático*

En el espacio de cabeza sobre una determinada muestra existen componentes en fase vapor a la temperatura ambiente a la cual se encuentran, o bien tienen una presión de vapor lo suficientemente elevada para evaporarse y producir una disolución gaseosa; en ambos casos el gas en sí mismo puede ser inyectado en el cromatógrafo de gases mediante una jeringuilla. La cantidad de gas que puede ser inyectado en cromatógrafo está limitada por la capacidad del inyector y la columna, también ha de considerarse el aumento de presión y flujo producido al ser inyectada una muestra gaseosa de un volumen relativamente grande. Normalmente la cantidad de muestra inyectada está comprendida entre 0,1-2 mL. La utilidad de este sistema de inyección depende de que existan suficientes cantidades de analito en el volumen de gas que se inyecta para la detección mediante cromatografía gaseosa.

En esta técnica la muestra se introduce en un vial cerrado y los compuestos volátiles presentes en la muestra pasan a formar parte del

espacio de cabeza. Si su concentración es próxima a 1ppm, podrán ser analizados por la inyección directa de una parte alícuota de la atmósfera en el cromatógrafo de gases.

La cantidad de analito inyectada depende de numerosos factores entre los que se incluyen la cantidad de componente presente en la muestra, la volatilidad del compuesto, la solubilidad del compuesto en la matriz y la cantidad de muestra en el interior del vial; por supuesto también ha de ser considerado el volúmen del vial con el que se trabaja.

Una vez introducida la muestra en el vial se ha de esperar un cierto tiempo hasta que se alcance el equilibrio entre la matriz del alimento y el espacio de cabeza, de tal forma que la concentración de muestra presente en el espacio de cabeza será igual a la cantidad total presente inicialmente en la muestra menos la existente en la matriz. Teniendo en cuenta el coeficiente de partición del componente entre el espacio de cabeza y la matriz acuosa, la cantidad de componente que se inyecta en el cromatógrafo depende de que volúmen del espacio de cabeza ha sido inyectado. Así, la concentración de analito inyectado es directamente proporcional al volúmen de la jeringuilla de inyección y a la cantidad de compuesto presente en el espacio de cabeza, e inversamente proporcional al volúmen del espacio de cabeza presente en el vial (Wampler, 1997).

La dinámica de trabajo requiere la introducción de la muestra en un vial y el calentamiento de la misma; de esta forma se favorece el enriquecimiento en componentes volátiles en el espacio de cabeza. Esta técnica presenta las ventajas de no utilizar disolvente en el análisis, así como el bajo coste de la instalación de la misma pero supone que, para compuestos presentes en la muestra a muy baja concentración, el método no tiene la suficiente sensibilidad para su determinación (Wampler, 1997).

### II.3.2.2.- *Espacio de cabeza dinámico / Purga y trampa*

Como su propio nombre indica, esta técnica envuelve el movimiento de analitos desde la matriz del alimento hacia el espacio de cabeza. La atmósfera que rodea al alimento es atravesada de forma continua por una corriente de gas portador que arrastra con él a los componentes volátiles presentes en el espacio de cabeza, facilitando la salida de estos desde la muestra hacia el mismo, sin necesidad de esperar a que se alcance el equilibrio químico entre las fases que conforman el sistema, además de incrementar el volumen de muestra utilizado más allá del volumen del vial que contiene la muestra. En este tipo de análisis es usual el empleo de volúmenes comprendidos entre 100 y 1000 mL de espacio de cabeza, asegurando de esta forma la captación de todos los componentes volátiles de la muestra problema.

La ventaja de este sistema es que todo este volumen es transferido directamente hacia el cromatógrafo de gases. El análisis se completa con el paso del gas portador a través de una serie de trampas que retienen los componentes volátiles, dejando pasar a través de ellas el gas portador. En este sentido los analitos presentes en el espacio de cabeza son concentrados en trampas, siendo denominado el sistema de espacio de cabeza dinámico como concentrador de muestras, mientras que cuando los componentes volátiles son arrastrados por un gas portador y atrapados para su determinación esta técnica también recibe el nombre de purga y trampa (“purge and trap”) únicamente en el caso de que la muestra sea líquida, como en el caso del zumo de naranja; si la muestra es sólida se le denomina como espacio de cabeza dinámico.

El atrapamiento de los componentes volátiles supone su adsorción en un material de gran superficie, ó bien atrapamiento por frío mediante condensación o congelación del analito en la trampa.

La selección de la técnica de atrapamiento y el medio, depende de diversos factores entre los que se incluyen: la naturaleza química

del analito, su estabilidad térmica, características de adsorción y desorción del material adsorbente, volumen del analito sobre el material, capacidad y coste del agente criogénico y por último la presencia de material contaminante entre la que se incluye el vapor de agua.

En el atrapamiento con material adsorbente, en los casos de idealidad, los componentes volátiles quedan atrapados a temperatura ambiente. En la siguiente etapa, la desorción se lleva a cabo mediante la revolatilización de los componentes retenidos por calentamiento de la trampa a temperaturas moderadas para evitar daños térmicos.

La mayoría de los materiales adsorbentes aplicados son polímeros porosos; Tenax (poli-2, 6-difenil-p-fenilen óxido) es el más utilizado en los análisis de espacio de cabeza dinámico (Wampler, 1997).

Padrayuttwat *et al.* (1996) estudian la idoneidad de diferentes materiales adsorbentes en la identificación de componentes volátiles en Citrus sudachi. Estos autores comparan la eficiencia de Tenax GC, Porapak Q, Carbón activo, gel de sílice y octadecil siloxano. Destacan que Tenax GC y Porapak Q muestran las mejores recuperaciones de compuestos, tanto de naturaleza polar como apolar, aunque Porapak retiene mejor los componentes de mayor polaridad y se obtiene un perfil más completo de los componentes aromáticos presentes en la muestra.

Una norma general es que a mayor capacidad de retención del polímero, o menor sea el tamaño de la molécula que pueda retener, mayor será la temperatura requerida para desorber analitos y regenerar la trampa. Un problema que se plantea con el uso de carbón activo y gel de sílice es su capacidad de retención de agua.

La dificultad en el empleo de material adsorbente es la incorporación de componentes contaminantes durante la desorción de los constituyentes volátiles a elevadas temperaturas. Esto se resuelve mediante el atrapamiento de componentes volátiles criogénicamente

(Badings *et al.*, 1985), nitrógeno líquido (-196°C) y dióxido de carbono sólido (-79°C) son los dos componentes escogidos para enfriar las trampas en las concentraciones criogénicas.

La técnica de espacio de cabeza en la identificación de componentes volátiles en zumo de naranja ha sido utilizada por numerosos autores. Así Nisperos-Carriedo y Shaw (1990) cuantificaron 20 componentes volátiles en el zumo de naranja mediante espacio de cabeza estático; Lizotte y Shaw (1992) con la misma técnica consiguen identificar 22; Moshonas y Shaw (1992) analizan zumos de naranja utilizando ambas técnicas de espacio de cabeza estático y dinámico y Shaw *et al.* (1993) identifican mediante el espacio de cabeza estático 19 componentes.

Aunque el uso del espacio de cabeza estático evita las pérdidas de componentes volátiles ocurridas mediante la extracción, Moshonas y Shaw (1995) encuentran que la pequeña cantidad de muestra utilizada por el inyector del espacio de cabeza estático permite sólo la cuantificación de unos pocos componentes volátiles en el zumo de naranja. Estos mismos autores en 1994 analizan los componentes volátiles mediante espacio de cabeza dinámico detectando y cuantificando 46 componentes del aroma en el zumo de naranja fresco.

El sistema de inyección mediante espacio de cabeza estático requiere una previa presurización del vial seguido de una liberación de presión para forzar un volumen controlado de gases de espacio de cabeza en la columna del cromatógrafo de gases. El calentamiento de la muestra y el incremento de la presión en el vial son los dos parámetros que pueden aumentar el tamaño de la muestra durante la inyección, pero la temperatura de calentamiento está limitada por el punto de ebullición del componente mayoritario, el agua, y la presurización está limitada por la construcción de un vial y septum presurizado. Las muestras de zumo de naranja analizadas mediante espacio de cabeza estático se suelen calentar de 80°C durante 15

minutos de equilibrio para obtener un tamaño de muestra aceptable (Shaw *et al.*, 1991).

### **II.3.3.- Microextracción en fase sólida**

Numerosos métodos analíticos han sido descritos para la determinación de la concentración de volátiles en zumos. Entre las técnicas más importantes destacan las de destilación-extracción simultánea, extracción con disolvente, espacio de cabeza entre las que se incluyen cromatografía de gases-olfatométrica, espacio de cabeza estático y dinámico (purge and trap) en cromatografía de gases,... No obstante, la mayoría de estos métodos requieren mucho tiempo, con pasos exhaustivos de concentración y en algunos casos cromatógrafos de gases equipados con instrumentación de espacio de cabeza. El desarrollo de nuevos métodos que puedan obviar en alguna manera estos inconvenientes continúa siendo objeto de investigación (Steffen y Pawliszyn, 1996).

La microextracción en fase sólida es una técnica de reciente introducción que evita estas dificultades y puede ser aplicada en la detección de componentes volátiles en bebidas de frutas tales como zumo de naranja (Zhang *et al.* , 1994).

En la actualidad es bastante conocido el empleo de materiales adsorbentes orgánicos para la extracción de trazas de componentes orgánicos en disoluciones acuosas, en el aire o en el suelo.

La microextracción en fase sólida es una de las técnicas más comúnmente utilizadas, dada la rapidez de extracción ó preconcentración de volátiles y semivolátiles en ausencia de disolvente. Esta técnica se basa en el coeficiente de reparto entre el compuesto orgánico, una disolución acuosa o fase vapor y una fina capa polimérica que recubre una fibra de sílice fundida (Harmon, 1997). La

técnica fue descrita por primera vez en 1989 por Berlardi y Pawliszyn para el análisis químico medioambiental en agua.

El primer paso consiste en la exposición de la fibra sobre la muestra, en la que quedan atrapados todos los analitos procedentes de la matriz. En una segunda etapa la fibra con los analitos concentrados se coloca en un sistema de desorción, seguida de la correspondiente separación y cuantificación cromatográfica.

Una adecuada calibración requiere que la extracción sea cuidadosamente controlada; cada componente tendrá un comportamiento diferente dependiendo de su volatilidad, polaridad, coeficiente de reparto fase orgánica/fase acuosa, el volumen de la muestra y/o del espacio de cabeza, la velocidad de agitación, el pH de la muestra y la temperatura, principalmente.

Para estas aplicaciones, se emplea una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria tipo cromatografía de gases, como puede ser polidimetilsiloxano, ya que la sílice fundida en sí misma es químicamente inerte y muy estable a altas temperaturas (Harmon, 1997). El tamaño pequeño y su estructura cilíndrica de la fibra permite ser introducida en una jeringuilla, la cual puede incorporarse fácilmente al inyector de un cromatógrafo de gases.

El sistema manual es una jeringuilla modificada, en la que un pistón polimérico móvil está situado dentro de un cilindro de acero inoxidable. Este se enrosca a su vez a un regulador de profundidad que permite guiar una aguja de punta plana la cual se conecta y se fija al resto del sistema a través de una nuez metálica. La fibra se encuentra en el interior de la aguja y se introduce en la muestra a través del septum sin que esta sea dañada.



### II.3.3.1.- Naturaleza del recubrimiento de la fibra

Debido a las diferentes características de los analitos a extraer se ha de considerar la adecuación de la naturaleza del material adsorbente e incluso de su soporte y preparación. Actualmente están disponibles en el mercado fibras de materiales no polares (polidimetilsiloxano) y fibras de materiales más polares (poliacrilato); de hecho de forma contemporánea se continúa trabajando en la búsqueda de nuevos materiales tipo Carbowax, Carboxen (soporte de carbón activado poroso) y copolímeros de divinil-benzeno. Para la mayoría de analitos, especialmente compuestos aromáticos polares, la fibra con recubrimiento de 100  $\mu\text{m}$  de polidimetilsiloxano es la más utilizada; en el caso en que se requiera un menor tiempo de equilibrio resulta más apropiado un recubrimiento de 30  $\mu\text{m}$ . Fibras con recubrimientos de 7  $\mu\text{m}$  obtienen resultados favorables en el caso de muestras que poseen un elevado punto de ebullición, como hidrocarburos poliaromáticos o también cuando son necesarias temperaturas muy elevadas para la desorción en el sistema de inyección del cromatógrafo de gases. No obstante, las fibras con recubrimientos de mayor espesor necesitan más tiempo para alcanzar el equilibrio con la disolución y poseen una mayor sensibilidad por la cantidad de analitos que pueden absorber (Harmon 1997).

Boyd-Boland *et al.* (1994) realizan un estudio comparativo de dos tipos de recubrimiento de fibra polidimetilsiloxano (PDMS) de naturaleza apolar y poliacrilato (PA) de naturaleza polar en la extracción de componentes volátiles del espacio de cabeza. PDMS resulta ser eficaz para un amplio rango de compuestos polares y apolares; esta fibra ofrece también una elevada afinidad con la fase estacionaria de la columna capilar empleada en este estudio. De otro lado, el empleo del recubrimiento de PA permite una extracción mucho

más rápida de compuestos más polares como metanol y etanol. El porcentaje de eficiencia de ambos recubrimientos fue calculado como el porcentaje de analito extraído de la disolución con la fibra; como resultado, se obtuvo una mayor extracción de componentes en PA, a excepción de los hidrocarburos terpénicos que fueron mucho mejor extraídos en PDMS.

La técnica SPME se basa en un sistema de equilibrio, por lo que se define como causa limitante la distribución de los volátiles entre las fases muestra-fibra o muestra-espacio de cabeza-fibra. En este mismo estudio también se determina que el tiempo medio para alcanzar el equilibrio con el empleo de PDMS es de 40 minutos, frente a 60 minutos aplicando PA. Dado que el PA tiene una estructura de polímeros cristalinos, los analitos difunden de forma más lenta a través del sistema; esto es lo que determina un tiempo de equilibrio más amplio. También ha de considerarse un coeficiente de reparto mayor en PA, por lo que la cantidad de analitos que deben ser absorbidos para alcanzar el equilibrio también es mayor (Steffen y Pawliszyn, 1996).

#### *II.3.3.2.- Mecanismo del proceso SPME*

En el análisis de componentes volátiles mediante SPME, la muestra se introduce en el interior de un vial herméticamente cerrado mediante un septum.

La fibra ha de limpiarse antes de efectuar cualquier análisis puesto que la fase polimérica adsorbe compuestos presentes en el aire que pueden producir ruidos de fondo en el análisis cromatográfico. La limpieza se realiza en poco tiempo introduciendo la fibra en un sistema de inyección auxiliar o en un sistema de limpieza para jeringuillas (Harmon, 1997).

Para el análisis de líquidos, la aguja se introduce a través del septum exponiendo la fibra mediante el empleo del émbolo en la muestra problema. Después de un tiempo considerado como tiempo de equilibrio, la fibra se introduce de nuevo en el interior de la aguja, insertándola directamente en la puerta de inyección de un cromatógrafo de gases un par de minutos. Las moléculas adsorbidas por la fibra automáticamente son desorbidas por efecto de la elevada temperatura del sistema de inyección.

Puesto que esta técnica implica el empleo de la preconcentración de sustancias muy diluidas, la relación de división del sistema de inyección debe ser fijado en un valor muy pequeño, en torno a 10:1. En algunas aplicaciones donde los componentes no se encuentran a nivel de trazas pueden emplearse divisiones más elevadas con adecuadas resoluciones. Es aconsejable el empleo de liner con diámetro interno inferior a 1 mm, para mejorar la resolución de los picos correspondientes a compuestos de elevada volatilidad; una resolución equivalente puede obtenerse con la introducción de lana de vidrio en el interior de un liner de mayor diámetro.

El enfriamiento criogénico de la columna, para la obtención de una mejor resolución de picos, no es necesario en esta técnica para ninguna de sus aplicaciones (Harmon, 1997).

La microextracción en fase sólida por inmersión de la fibra en la muestra acuosa se basa en el reparto de analitos entre la matriz de la muestra y el medio de extracción, siendo la cantidad de analito absorbido por la fibra directamente proporcional a su concentración en la muestra:

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s / K_{fs} + V_s,$$

n se considera la masa de analito retenida por la fibra,  $V_f$  y  $V_s$  los volúmenes de la fibra y de muestra respectivamente y  $K_{fs}$  el coeficiente de reparto del analito entre el polímero de la fibra y la matriz; por último

$C_0$  indica la concentración del analito en la muestra. De la ecuación puede deducirse que existe una correlación lineal entre la cantidad de analito absorbida en la cubierta de la fibra y la cantidad de analito presente en la muestra. Dado que las fibras utilizadas en SPME tienen una elevada afinidad por los componentes orgánicos los valores de  $K_{fs}$  para los analitos son bastante elevados, lo cual significa que el SPME tiene un buen efecto de concentración y, por tanto, una adecuada sensibilidad, aunque en la mayoría de los casos los valores de  $K_{fs}$  no son lo suficientemente elevados como para obtener una concentración exhaustiva de todos los analitos en la matriz. (Zhang y Pawliszyn, 1993).

Para realizar una determinación exhaustiva a nivel cuantitativo - más del 90% del analito capaz de ser retenido por la fibra ha de ser adsorbido- se ha de considerar que el coeficiente de reparto de dicho componente entre la matriz y la fibra sea mayor que el cociente  $V_s / V_f$  (Louch *et al.*, 1992).

Cuando la velocidad de transferencia de masa está determinada por la difusión del analito en la fibra, la mayoría de ellos alcanzan el equilibrio en un tiempo inferior a un minuto (Louch *et al.*, 1992). La rápida extracción está asegurada por el grosor de la capa de recubrimiento que oscila entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  de espesor. En la práctica, este efecto puede ser conseguido en muestras gaseosas dado el alto valor de coeficiente de reparto; en el caso de muestras sólidas, para conseguir el equilibrio es necesario el empleo de agitación ó de ultrasonidos (Motlagh y Pawliszyn 1993).

#### II.3.3.3.- *Efecto de la agitación en SPME por inmersión*

En este caso, la aplicación de agitadores magnéticos aumenta el tiempo para alcanzar el equilibrio debido a la difusión de componentes

a través de la fina capa de agua que rodea el recubrimiento de la fibra. (Zhang y Pawliszyn, 1994).

Louch *et al.*, en 1992 comparan métodos de agitación mediante pruebas con diferentes velocidades de agitación, demostrando que este parámetro afecta de forma acusada a la velocidad de transferencia de masa. También la longitud de la cadena del polímero, su configuración y el grado de entrecruzamiento, que varían con el método de síntesis utilizado, explican algunas variaciones entre las propiedades de difusión. Por ello, muchas veces el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es mucho mayor que el tiempo teórico calculado, lo que puede justificarse por una agitación inadecuada (no ha sido lo suficientemente vigorosa como para poder explicar que el proceso de adsorción sólo depende del transporte de masa a través del polímero). Estos autores afirman que una disminución de la velocidad de agitación conlleva un incremento del tiempo de extracción, como consecuencia del transporte de masa a través de la capa estacionaria de agua que rodea la fibra.

La posibilidad de aplicación de ultrasonidos mejora el transporte de masa, pero no puede compararse la eficiencia con la de la máxima agitación; la curva correspondiente al tiempo de equilibrio alcanzado con el empleo de la sonificación equivale a una velocidad de agitación del 50%; estos resultados se explican teniendo en cuenta el bajo efecto de los ultrasonidos a través de las paredes de cristal del vial.

Un método distinto de agitación investigado realiza la exposición y extracción de la fibra dentro de la disolución a la velocidad de una inserción-retracción por segundo, para minimizar el grosor de la capa estática en la superficie de la fibra, moviendo la fibra en dirección transversal al de la matriz. La reducción del tiempo de extracción es pequeña comparada con la no agitación de la muestra.

Otro parámetro que controla la absorción del analito por la fibra es la constante de reparto fibra/agua del propio analito. La selectividad de la fibra por el analito ha de ser escogida con criterios análogos a los de elección de la fase estacionaria en cromatografía de gases.

Las limitaciones debidas a la transferencia de masa por la difusión del analito en agua se superan haciendo el análisis en el espacio de cabeza, teniendo en cuenta que los coeficientes de difusión de las partículas en un gas son de cuatro veces superiores a las del agua y al mismo tiempo se elimina el efecto matriz (Zhang y Pawliszyn, 1993).

#### *II.3.3.4.- Análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza mediante SPME*

El uso del espacio de cabeza permite ampliar el empleo de SPME al análisis de muestras sólidas, incluso en el caso de matrices complejas (Louch *et al.*, 1992).

Los límites de detección de SPME en espacio de cabeza según lo expresado por Zhang y Pawliszyn (1993) pueden alcanzar niveles de ppt, cuando se emplea en la detección de los componentes volátiles un detector de captura iónica, y no se observan diferencias de sensibilidad entre la técnica de SPME directa y el espacio de cabeza.

En el espacio de cabeza mediante SPME, tres fases (fibra, espacio de cabeza y matriz) están implicadas. La diferencia del potencial químico de los analitos entre las tres fases es la fuerza impulsora que los conduce desde la matriz hacia la superficie de la fibra. Para muestras acuosas los coeficientes de reparto espacio de cabeza /agua están directamente relacionadas con la constante de Henry, las cuales están determinadas por la volatilidad e hidrofobicidad de los componentes.

Un modelo unidimensional cinético ha sido desarrollado por Zhang y Pawliszyn (1993), para explicar el proceso de difusión que

implica la técnica de SPME. La modalidad de espacio de cabeza puede ser utilizada eficientemente para aislar componentes volátiles con una constante de Henry superior a  $90 \text{ atm cm}^3 / \text{mol}$ .

Para entender la cinética y el equilibrio químico han de examinarse previamente las tres fases que conforman el sistema: recubrimiento polimérico de la fibra, el espacio de cabeza y la disolución acuosa. La cantidad de analitos adsorbida por la capa polimérica está relacionada con el equilibrio global de los analitos en las tres fases del sistema.

La cantidad total de cada componente, en el sistema conformado por las tres fases, puede expresarse mediante la ecuación:

$$C_0 V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V_3,$$

donde  $C_0$  es la concentración inicial del analito en la disolución acuosa,  $C_1^\infty$ ,  $C_2^\infty$ ,  $C_3^\infty$ , son las concentraciones en equilibrio en el recubrimiento, en la disolución acuosa y en el espacio de cabeza respectivamente, siendo  $V_1$ ,  $V_2$ , y  $V_3$ , los volúmenes de cada una de las fases.

Dado que el coeficiente de partición fibra / espacio de cabeza es  $K_1 = C_1^\infty / C_3^\infty$  y el coeficiente de reparto espacio de cabeza / disolución acuosa  $K_2 = C_3^\infty / C_2^\infty$ , la cantidad de analito absorbido por la fibra, es decir la capacidad de absorción de la fibra, puede expresarse como:

$$n = C_0 V_1 V_2 K_1 K_2 / (K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2).$$

En muestras acuosas la mayoría de las constantes de reparto espacio de cabeza/agua tienen valores pequeños, por debajo de 0,25, por lo que la capacidad del espacio de cabeza para atrapar analitos es pequeña, pero el análisis del espacio de cabeza no afectará a la cantidad de analito adsorbido por la fibra si el volumen del espacio de cabeza es mucho menor que el de la muestra acuosa ( $V_3 \ll V_2$ ); como resultado, en este caso la sensibilidad de la técnica en espacio de

cabeza es casi la misma que en la inmersión directa (Zhang y Pawliszyn, 1993).

Esta ecuación informa de la cantidad de analito adsorbido por la fibra cuando el equilibrio ha sido alcanzado. Por otro lado, la cinética del transporte de masa en la cual los analitos son transferidos desde la disolución acuosa hasta el recubrimiento polimérico de la fibra determina el tiempo necesario para realizar el análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza.

El equilibrio se alcanza cuando la concentración de los analitos en cada una de las fases que conforman el sistema es constante, es decir, se han satisfecho los valores de las constantes de partición entre fases adyacentes.

En la práctica se define el tiempo de equilibrio como el tiempo al cual la masa adsorbida por la fibra ha alcanzado el 90% de la cantidad total que podría ser absorbida por la misma, es decir, la concentración absorbida a tiempo infinito (Zhang y Pawliszyn, 1993).

Un hecho importante a destacar es la existencia de un punto de retardo durante el proceso de extracción. El perfil de la curva que define la velocidad de transferencia de analitos en el tiempo desde la matriz hacia el espacio de cabeza presenta un primer tramo de pendiente elevada seguido de un segundo tramo en el que se observa una disminución de la pendiente como consecuencia de la reducción de la concentración de analitos en la matriz hasta alcanzar el tiempo de equilibrio; este comportamiento también está condicionado por el transporte convectivo y difusivo de los analitos en el interior de la matriz.

El tiempo al cual se alcanza el máximo de adsorción es denominado como tiempo de retardo.

Este tiempo de retardo se justifica por la lenta difusión de los analitos en la fase acuosa, de tal forma que a igualdad de valores de  $K_2$ , para valores de  $K_1$  suficientemente pequeños, el 90% de la masa ha sido adsorbida en ese punto. Sin embargo, para valores de  $K_1$  elevados



en este punto únicamente se absorbe el 70 % de la masa total. Según lo expresado por estos autores en algunos casos el valor del tiempo de retardo puede coincidir con el de equilibrio, y el análisis del espacio de cabeza se realiza de forma efectiva siempre que se trabaje en un medio acuoso estático.

Para valores de la constante de reparto  $K_2$  muy pequeños, la concentración del analito en el espacio de cabeza es muy baja y, si además este presenta una elevada  $K_1$ , el tiempo para alcanzar el equilibrio será bastante prolongado, y la cantidad de analito absorbida por la fibra en el tiempo de retardo está bastante alejada de la retenida en el tiempo de equilibrio.

De estos resultados se deduce que en el caso de una disolución acuosa estática, los volátiles han de tener una elevada constante de Henry, consecuencia de su elevada volatilidad e hidrofobicidad y no deben tener una constante de reparto elevada entre la fibra y el espacio de cabeza.

#### *II.3.3.5.- Optimización de SPME en espacio de cabeza*

Numerosos factores pueden influir en la cantidad de analitos extraídos mediante SPME, tales como volúmen del material adsorbente, características del mismo, derivatizaciones del analito, modificación de la matriz, agitación de la muestra, enfriamiento de la fibra, modificación de la fuerza iónica de la matriz,...

#### *II.3.3.5.1.- Efecto de la agitación de la fase acuosa*

La técnica en espacio de cabeza se mejora con el empleo de la agitación continuada de la muestra como consecuencia de una uniformidad en la concentración de volátiles en la matriz y la constante disponibilidad de los mismos en la superficie en contacto con el espacio de cabeza, es decir, el transporte de masa es mucho más rápido que en las otras dos fases, con lo cual deja de ser el paso limitante del sistema.

El coeficiente de reparto entre el sistema acuoso y el espacio de cabeza suele tener un valor próximo a 0.2, por lo que la agitación del sistema facilita la salida de volátiles hacia el espacio de cabeza y en condiciones en que el coeficiente de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza sea elevado, el tiempo requerido para alcanzar el tiempo de equilibrio será menor que en ausencia de agitación.

En el segundo equilibrio fibra/espacio de cabeza la transferencia de componentes volátiles es más rápida dado que el coeficiente de difusión en esta interfase tiene un valor más elevado, lo que hace que la transferencia de masa en el equilibrio agua-espacio de cabeza-fibra sea más rápida que en el paso directo agua-fibra (Zhang y Pawliszyn, 1993).

Estudios realizados por Penton (1996) sobre el efecto de la agitación de la fase acuosa, demuestran que esta es efectiva para incrementar la respuesta de componentes de baja volatilidad, no siendo necesaria para componentes volátiles.

#### *II.3.3.5.2.- Efecto de la temperatura*

Un aumento de la temperatura conlleva un coeficiente de reparto mayor en el equilibrio matriz/espacio de cabeza, favoreciendo de esta

forma el proceso de extracción. No obstante, temperaturas elevadas pueden afectar al coeficiente de reparto del sucesivo equilibrio entre el espacio de cabeza y la superficie de la fibra; en base a esto se habla de un óptimo de temperatura, dependiente de las interacciones entre analitos, fibra y matriz (Penton 1996).

Zhang y Pawliszyn en 1996, demuestran que la sensibilidad del método puede aumentarse por el calentamiento de la fase acuosa, pero al mismo tiempo ha de darse el enfriamiento de la fibra mediante una corriente de CO<sub>2</sub> líquido.

Para la extracción de volátiles en muestras sólidas se requiere el calentamiento de la muestra (Zhang y Pawliszyn, 1993); la cantidad de volátiles aumenta significativamente si el muestreo se realiza a alta temperatura, pero el problema se plantea cuando la fibra se calienta, ya que esta comienza a tener pérdida de capacidad para adsorber volátiles. En condiciones normales existe un óptimo de temperatura; lo ideal sería realizar el muestreo calentando la muestra a alta temperatura manteniendo la fibra a baja temperatura y de esta forma adicionando también agua puede hacerse una extracción cuantitativa de compuestos tipo tolueno, xileno,..., que teniendo un coeficiente de reparto pequeño serían imposibles de analizar a temperatura ambiente.

La optimización de la extracción de componentes volátiles en zumo de naranja mediante SPME ha sido recientemente estudiada por Mingyu Jia *et al.* (1998). Estos autores estudian el efecto de diferentes temperaturas (25 a 80°C) sobre el tiempo de equilibrio con PDMS como recubrimiento polimérico. Resaltan que el aumento de la temperatura supone una reducción del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre fases, pero a su vez una disminución de la cantidad de analito retenida por la fibra, como consecuencia de la disminución de la constante de reparto entre los gases que conforman el espacio de cabeza y el recubrimiento polimérico.

#### II.3.3.5.3.- *Efecto de la adición de sal*

La naturaleza de la matriz puede ser modificada para influenciar el coeficiente de reparto de los analitos entre fibra y matriz. Por ejemplo, añadiendo una sal a la muestra acuosa (NaCl, Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) la fuerza iónica del medio se exalta, de esta forma aumenta el reparto de componentes polares (no iónicos) hacia la fibra, porque la forma neutra es atraída más eficientemente por el recubrimiento polimérico apolar; el pH de la muestra acuosa también puede ser ajustado para prevenir la ionización de los analitos.

Estudios realizados por Yang y Peppard (1994) muestran que, generalmente, la presencia de electrolitos en un sistema de adsorción puede afectar en dos aspectos: cambiando la polaridad de la fase limitante y disminuyendo la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa. Este último es conocido como efecto de “salting out”, una disminución de la solubilidad del agua favorece el coeficiente de reparto entre el espacio de cabeza y la fase acuosa.

A su vez, definen la influencia de la sal sobre la absorción de un conjunto variado de componentes volátiles en SPME, destacando la existencia de cuatro tipos de comportamientos distintos. Un primer grupo, en el que se incluyen la mayoría de los componentes estudiados, en que la adsorción aumenta con el incremento de la concentración salina, y entre los que destacan butirato de etilo, cis 3-hexen-1ol, linalol, neral y carvona, todos ellos presentes en la fracción aromática del zumo de naranja.

Un segundo grupo de componentes en los que la adsorción aumenta inicialmente alcanzando un punto en el que una elevada concentración salina no afecta a la adsorción que permanece

constante, como sucede con acetato de etilo, también presente en la fracción aromática del zumo de naranja.

Un tercer grupo incluye aquellos componentes en los que la adsorción aumenta inicialmente disminuyendo más tarde con el aumento de la concentración salina.

Finalmente, un cuarto comportamiento en el que la absorción disminuye para elevadas concentraciones salinas, caso del limoneno, que es el terpeno mayoritario de la fracción aromática de la naranja.

Estudios realizados por Steffen y Pawliszyn (1996), sobre el efecto “salting out”, muestran que una disminución de la solubilidad del agua favorece el coeficiente de reparto entre el espacio de cabeza y la fase acuosa. Para ello estudiaron el efecto de tres concentraciones diferentes de sal (15%, 36% y 42%) sobre la adsorción en el recubrimiento de poliacrilato, determinando un valor óptimo de adición de sal (saturación al 36%) por encima del cual la recuperación disminuye por efecto del “salting in”, excepto en el caso del  $\alpha$ -pineno, para el que la extracción se favorece con la ausencia de sal y del etanol y hexanol, en los que una adición de sal al 42% mejora en gran medida la adsorción sobre poliacrilato.

A su vez demuestran que la disminución del pH en la matriz produce una disminución de reparto de analitos del zumo a la fibra y en base a esto justifican la escasa extracción de volátiles en la matriz modelo de pH equivalente al zumo de naranja.

#### II.3.3.6.- *Naturaleza del recubrimiento y manipulación de la fibra*

Esta técnica puede ser empleada para la extracción de componentes volátiles y semivolátiles. Aunque se trate de un equilibrio químico, puede aplicarse para una extracción exhaustiva ya que si el coeficiente de reparto entre la fibra y la matriz es elevado, la cantidad

de analitos adsorbidos únicamente pasa a depender de la concentración inicial de los mismos en la muestra y del volumen de la misma (Zhang y Pawliszyn, 1994).

La microextracción en fase sólida consta de dos etapas: adsorción de analitos sobre la fibra y desorción de los mismos en el sistema analítico de instrumentación, generalmente cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama o acoplada con espectrometría de masas. Parámetros como la velocidad, la reproducibilidad y la precisión del método dependen de la fase de extracción. La etapa de la desorción, que está estrechamente relacionada con la eficiencia de la separación cromatográfica y la precisión del análisis cuantitativo, regula en su totalidad las posibilidades de utilización potencial del método. Estudios realizados por Arthur *et al.* (1992), sobre la optimización de la microextracción en fase sólida, muestran que esta se consigue teniendo en cuenta factores como la profundidad de la aguja y de la fibra en el interior del vial, tiempo de adsorción, profundidad de la fibra en el inyector y tiempo de desorción dentro del inyector.

La localización de la fibra dentro del inyector es un parámetro importante a determinar, ya que si la fibra se sitúa en la parte alta del inyector menor cantidad de analitos serán desorbidos, debido al gradiente de temperatura existente en el interior del inyector, especialmente para compuestos menos volátiles.

El efecto de la temperatura del inyector se estudia considerando la aplicación de un gradiente de temperatura desde temperatura ambiente hasta la programada, encontrando que no existen diferencias entre la aplicación de una isoterma y el gradiente de temperaturas. Estos autores deducen que la temperatura óptima del inyector ha de ser ligeramente superior al punto de ebullición más elevado de los componentes que se determinan.

Otro aspecto estudiado es el tiempo de desorción que debe permanecer la fibra en el interior del inyector, encontrando que

manteniendo la fibra a 150°C durante 2 minutos no se observan restos de analítos retenidos en la fibra, y no se produce degradación del recubrimiento después de 100 inyecciones sucesivas en cromatografía de gases.

Según la ecuación definitoria de la cantidad de analito adsorbido por la fibra, esta es directamente proporcional al volúmen del material adsorbente y la sensibilidad mejora proporcionalmente con el espesor del mismo, la longitud de la fibra o ambos simultáneamente (Louch *et al.*, 1992).

Con relación a la naturaleza del recubrimiento de la fibra, para compuestos de naturaleza apolar o moderadamente polar, el análisis mediante SPME permite la extracción de picogramos de analito a partir de muestras con concentraciones de ppb, cantidades que permiten la identificación y cuantificación mediante captura de iones o espectrometría de masas. A pesar de que tanto la matriz como el material adsorbente de la fibra compiten por atrapar analítos, la afinidad hacia la fibra es crucial en el muestreo mediante SPME; compuestos no polares resultan ser más fácilmente extraíbles mediante material no polar y viceversa; cuando los compuestos son polares la afinidad de los analítos por el recubrimiento de la fibra ha de superar la afinidad por la matriz acuosa. El polidimetilxilosano es un recubrimiento de naturaleza apolar ideal para la extracción de compuestos no polares como benceno, tolueno, etil benceno e isómeros del xileno y para hidrocarburos poliaromáticos en matrices acuosas, pero no puede extraer compuestos polares tipo fenoles y derivados. El poliacrilato, material adsorbente muy polar, extrae fenoles y derivados de forma eficiente pero no permite elevada sensibilidad en la extracción de compuestos de naturaleza benzénica. De hecho la constante de reparto fibra/agua para componentes apolares con polidimetilxilosano resulta mayor respecto al poliacrilato (Zhang y Pawliszyn, 1994).

La derivatización puede ser utilizada para reducir la polaridad de compuestos de naturaleza polar y de esta manera incrementar sus coeficientes de reparto fibra/agua y al mismo tiempo mejorar la separación cromatográfica (Louch *et al.*, 1992). En SPME los analitos polares pueden ser derivatizados en medio acuoso, o bien directamente puede ser modificada la naturaleza de la fibra con un reactivo derivatizante; de esta manera se realiza simultáneamente la extracción y la derivatización hacia compuestos análogos de menor polaridad, más susceptibles al análisis por cromatografía de gases. Con la derivatización la cantidad de analito adsorbida por la fibra es mayor como consecuencia de que la relación de concentraciones entre la fibra y el espacio de cabeza no alcanza rápidamente el valor de equilibrio ya que los componentes polares siguen derivatizándose al ser adsorbidos por la fibra. La reacción tiene una cinética de primer orden, donde la cantidad que se acumula en la fibra es proporcional a la integral de la concentración del analito en el espacio de cabeza durante el periodo de tiempo en el que la fibra esta expuesta (Zhang y Pawliszyn, 1994).

#### II.3.3.7.- *Análisis cuantitativo en SPME*

Dado que la técnica de SPME se basa en el equilibrio entre fases, es necesario una calibración para el análisis cuantitativo. El equilibrio en la extracción se alcanza cuando la concentración del analito es homogénea en las tres fases y las distintas concentraciones por cada par de fases satisfacen los valores de su respectivo coeficiente de reparto. En la práctica se suele definir como tiempo de equilibrio al tiempo en que la masa adsorbida por la fibra es el 90% de la capacidad total de la fibra (Zhang y Pawliszyn, 1993). Este puede calcularse sobre la base del punto de cambio de pendiente de la curva donde se representa la masa adsorbida en función del tiempo. Cuando el valor



de la constante de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza es elevado, mayor número de analitos son adsorbidos por la fibra al alcanzar el tiempo de equilibrio; cuanto mayor sea el coeficiente de reparto mayor es el tiempo para alcanzar el equilibrio, que a su vez depende de la generalmente lenta difusión de analitos en la fase acuosa. Zhang y Pawlisyn (1993) demuestran que para un valor determinado de la constante de reparto líquido/espacio de cabeza, aunque se varíe el valor de la constante de reparto fibra/espacio de cabeza, el tiempo en alcanzar el equilibrio apenas si se modifica; de hecho el coeficiente de difusión en la fibra es menor que en la fase acuosa, pero el volumen de la fibra es muy pequeño comparado con las otras fases, por lo que el tiempo de difusión en el interior de la fibra es mucho menor.

En el caso en que el valor de la constante de reparto fibra/espacio de cabeza sea elevado, cuando el analito tiene un valor de reparto espacio de cabeza/agua pequeño, de acuerdo con la ley de Henry, la concentración de analito en el espacio de cabeza es baja, la extracción en el espacio de cabeza afecta a la concentración en la fase acuosa, por lo que se necesita mucho tiempo para alcanzar el equilibrio.

Teniendo en cuenta la incidencia de los valores de las constantes de reparto en el tiempo de equilibrio, puede decirse que la aplicación del método SPME en espacio de cabeza para una disolución acuosa estática requeriría componentes con elevado valor de la constante de Henry, que puede ser resultado de una alta volatilidad e hidrofobicidad de los mismos, no debiendo tener un coeficiente de reparto elevado entre la fibra y el espacio de cabeza. Los compuestos orgánicos normalmente cumplen estos requerimientos, pero podría ser utilizado para diferenciar componentes volátiles de aquellos con menor volatilidad (Zhang y Pawliszyn, 1993).

A temperatura ambiente puede emplearse el espacio de cabeza en SPME, siendo bastante eficiente para aislar compuestos con una

constante de Henry elevada, sobre  $90 \text{ atm. cm}^3 / \text{mol}$ , aunque también puede ser empleado para compuestos menos volátiles con una alta sensibilidad, pudiendo llegar a ser cuantificados sin alcanzar el equilibrio.

Steffen y Pawliszyn (1996), estudian los componentes volátiles del zumo de naranja en el espacio de cabeza, considerando el paso limitante la difusión de analitos desde la fase acuosa hacia el espacio de cabeza. En el caso del zumo de naranja dada la complejidad de la matriz, esta en si misma puede ser considerada como un paso limitante del transporte de analitos a través del zumo. Igualmente sucede con el transporte de analitos a través del sistema, teniendo en cuenta la presencia de sólidos suspendidos, el potencial de la emulsión, la porción de analitos que puede quedar atrapada en los poros ó células de estas partículas (pulpa), que para ser extraídas deben atravesar la capa estática de agua en el interior de la pulpa, penetrar en la pared celular, difundir en el líquido del zumo, y cumplir el reparto en el espacio de cabeza y difusión a través de la fibra.

Cuando la muestra es gaseosa el calibrado resulta fácil y la cantidad de analitos extraídos mediante la fibra se correlaciona linealmente con el coeficiente de reparto que está determinado por la humedad y la temperatura (Zhang y Pawliszyn, 1994).

La calibración en muestras se lleva a cabo con la adición de un estándar interno (Potter y Pawliszyn, 1994), cuyo coeficiente de reparto ha de ser similar al de los analitos; compuestos isotópicamente análogos a los analitos son los mejores estándares internos por sus propiedades químicas y físicas parecidas.

#### **II.3.4.- Separación e identificación de componentes volátiles**

La introducción a principios de la década de los cincuenta de la cromatografía gaseosa supuso un gran avance en el análisis de componentes volátiles (Wright, 1997), que con los desarrollos que la técnica ha venido experimentando a lo largo de todo este tiempo ha permitido el amplio conocimiento que actualmente se tiene sobre la fracción aromática de los alimentos y de muchos de los componentes responsables de estas características.

El primer análisis de componentes volátiles en zumo de naranja dulce empleando cromatografía gas-líquido fue realizado en 1961 por Wolford y Attaway; desde entonces numerosos trabajos se han realizado con diferentes objetivos, tales como conocer la calidad del aroma en la fruta fresca o en los productos derivados, el estudio de la calidad tecnológica y prevenir las reacciones de degradación de los mismos (Pino *et al.*, 1981).

En base a esto la cromatografía de gases permite desvelar gran cantidad de información a cerca de la composición en constituyentes volátiles del aroma en un alimento. El proceso básico conlleva la separación en columna de la mezcla en forma vapor de componentes seguido de la detección en un detector universal; este proceso recibe el nombre de cromatografía gaseosa unidimensional (Wright, 1997).

Una de las limitaciones de este proceso es la incapacidad de asignar una identificación definitiva, estructural ó información del grupo funcional de los picos cromatográficos aislados, con lo cual queda restringida a la separación absoluta de componentes volátiles. Por este motivo diferentes técnicas han sido desarrolladas y utilizadas para eliminar las limitaciones de la cromatografía gaseosa unidimensional e incrementar la calidad y cantidad de información que puede ser extraída de una separación cromatográfica.

#### II.3.4.1.- *Cromatografía de gases multidimensional*

Bertsch (1978), define las cualidades que ha de reunir una técnica para que pueda ser englobada dentro del marco del análisis multidimensional. Estas pueden agruparse en dos:

- 1.- Sistema provisto de dos columnas con diferente selectividad en combinación con un sistema (integración, espectrometría de masas, etc.) que pueda permitir asignar índices de retención, ó
- 2.- Sistema provisto de dos columnas de diferente selectividad y un dispositivo para transferir selectivamente una porción cromatográfica de una columna a otra.

En la práctica tales definiciones restrictivas dejan fuera un número de técnicas y conceptos que son más útiles para eliminar las limitaciones del sistema unidimensional (Wright, 1997), por lo que para cualificar una técnica bajo el nombre de análisis multidimensional deberá ir acompañada de:

- 1.- Prever un aumento en la información cualitativa, considerando identificación de picos, funcionalidad u otras características que podrían ser previstas de otra manera mediante el análisis monodimensional.
- 2.- Incremento de la resolución de picos más allá de lo que podría alcanzarse a través de mejoras en la eficiencia de una simple columna.

Existen numerosas técnicas analíticas que reúnen estas características y entre estas se incluyen técnicas de cromatografía gaseosa en las que una simple columna de cromatografía de gases está unida a un sistema de caracterización de estructuras químicas, como la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (Ligon y May, 1984, Gordon *et al.*, 1988), cromatografía gaseosa-

espectrometría infrarroja transformada de Fourier, cromatografía gaseosa acoplada a un detector de emisión atómica y cromatografía gaseosa-ICP (inductively coupled plasma) (Gordon *et al.*, 1988).

Otro sistema de detección puede ser utilizado para la ampliación de la información cualitativa obtenida de una separación simple en columna con el uso de detectores selectivos múltiples operando en paralelo. En este proceso el efluente de una columna cromatográfica es dividido entre dos o más detectores presentando diferentes selectividades (Wang *et al.*, 1983). Este mecanismo hace posible utilizar las relaciones de respuesta de dos detectores para confirmar la identificación del pico cromatográfico, o posiblemente asignar funcionalidad química o características sensoriales. Las configuraciones que son bastante empleadas en el campo de perfiles aromáticos son las que emplean detector de fotoionización/detector fotométrico de llama, detector de fotoionización/detector de nitrógeno fosforado (Parliment y Spencer, 1981; Stan y Mrowtez, 1983) y detector de fotoionización/detector olfatométrico (Tachotikul y Hsieh, 1989).

También es posible la aplicación de detectores selectivos operando en serie; esta resulta ser la más útil de las estrategias empleadas para determinación de aromas, siempre y cuando un de los dos detectores no sea destructivo con la muestra. Los detectores de conductividad térmica y fotoionización cumplen este requisito y son empleados como primeros detectores en una variedad de configuraciones de detectores acoplados en serie (Phillips y Gratzfeld-Husgen, 1984; Driscoll, 1985).

En las experiencias realizadas por estos autores el detector de conductividad térmica tiene utilidad limitada para el estudio de los aromas dado que tiene escasa sensibilidad y selectividad. En la práctica se encuentra que el detector de fotoionización posee una excelente sensibilidad en el campo de detección de los componentes

aromáticos que son importantes en la respuesta olfativa humana (Langhorst, 1981).

Gran cantidad de configuraciones incorporan el detector de fotoionización como parte de un sistema de detectores acoplados en el campo de perfiles aromáticos. Entre ellos, se incluyen: detector de fotoionización-detector fotométrico de llama, detector de fotoionización-nitrógeno fosforado, detector de fotoionización-quimioluminiscencia. En cada uno de estos casos el detector de fotoionización se utiliza como detector de elevada sensibilidad, ya que obtiene respuesta para la mayoría de los componentes volátiles que son importantes para la respuesta olfatométrica.

Tachotikul y Hsieh, (1989), demuestran que en el sistema de acoplamiento de detectores el más útil de todos es el detector de fotoionización acoplado a un detector olfatométrico, por ejemplo un “sniff-port”. En este caso el investigador puede oler directamente el efluente y asignar un aroma u olor descriptivos para cada uno de los picos que eluyen del detector de fotoionización.

#### *II.3.4.2.- Captura iónica - Espectrometría de masas*

Cada paso de un método analítico proporciona información que puede ser utilizada en la caracterización de una mezcla compleja de componentes volátiles. Gran parte de esta información puede obtenerse con el empleo de un sistema que combina la cromatografía de gases con un detector multicanal (espectrómetro de masas).

La espectrometría de masas de forma simultánea ofrece información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición en constituyentes volátiles de interés en un alimento, siendo esta una de las técnicas más empleadas en tales análisis (Huston, 1997).

La espectrometría de masas es una técnica donde el analito a la salida de una columna cromatográfica es primeramente ionizado con la finalidad de obtener una nube de fragmentos de iones con una distribución de relaciones carga/masa. Mediante la separación de estos fragmentos iónicos en base a su relación carga/masa y la medida de las intensidades de las señales se obtiene un espectro de masas que define las características del compuesto.

En la mayoría de estos instrumentos una transmisión cuádruple, proporciona espectros de masas mediante barrido secuencial a través de un marco instrumental que selectivamente permite el paso de iones con relación carga/masa específica en el espectrómetro de masas. Estos filtros de masas son utilizados comúnmente en el análisis de sustancias con concentraciones por debajo de los nanogramos (March y Hughes, 1989).

Los mismos campos eléctricos de los instrumentos de transmisión cuádruple, pueden ser obtenidos mediante el empleo de electrodos con diferentes geometrías para establecer una trampa iónica (March y Todd, 1995). La trampa iónica retiene y concentra los iones antes de su análisis en el espectrómetro de masas, de esta forma es más selectivo que un filtro de masas.

#### II.3.4.3.- *Cromatografía de gases olfatométrica*

El término de OAV (odor activity value), fue introducido en 1957 por Patton y Josephson, poco después de la introducción de la cromatografía gaseosa por James y Martin en 1952 (Mistry, *et al.*, 1997).

El progreso en el análisis instrumental en la identificación de componentes volátiles ha contribuido a la identificación masiva de los mismos (Maarse y Visscher, 1989), pero desafortunadamente la

relevancia sensorial de esos componentes no ha sido extendidamente evaluada, a pesar de que el uso de la nariz humana como detector sensitivo en cromatografía de gases fue propuesto por Fuller *et al.* (1964).

Uno de los mayores problemas en el estudio de los aromas es seleccionar a aquellos compuestos que significativamente contribuyen al aroma en los alimentos.

El término de flavor usualmente es dividido entre los conceptos de sabor y olfato que son percibidos en la boca y en la nariz respectivamente. No obstante, el término de flavor en muchas publicaciones queda referido únicamente a los aromas. Los conceptos de olor y aroma no están bien definidos y frecuentemente son utilizados como sinónimos. El término de olor es mejor reservarlo para olfatear el alimento antes de ser introducido en la boca (percepción nasal); el aroma es una percepción retronasal del alimento en la boca (Blank, 1997).

La fracción volátil de un alimento esta constituida por un gran número de componentes de los que sólo unos pocos son significativos en la determinación del flavor. Una tarea importante es la de distinguir o diferenciar los compuestos fuertemente activos de aquellos menos activos presentes en los alimentos (Grosch, 1993).

El primer paso en la estimación de la importancia de un componente del flavor en un alimento determinado es el cálculo de la relación entre su concentración y su valor umbral en el flavor (Rothe y Thomas 1963; Meilgaard 1975); cuando el olor es percibido nasalmente y retronasalmente, o para su umbral de olor, cuando el olor es eventualmente solo nasal. El resultado se denomina como “valor de aroma”, “unidad de flavor” “valor de olor” o “valor de actividad-olor”.



El análisis del flavor en un alimento es más eficiente cuando las posiciones de los compuestos más importantes en el olor han sido previamente localizados en un cromatógrafo de gases capilar. En la práctica, el examen del efluente de un cromatógrafo de gases con columna capilar mediante detección del olor es comúnmente utilizado como primer paso en el análisis del flavor y es conocido como cromatógrafo de gases olfatométrico.

El número de volátiles detectados por el cromatógrafo de gases olfatométrico no sólo depende del valor umbral de detección de los mismos, sino que también depende de parámetros arbitrariamente seleccionados, tales como cantidad de muestra, dilución de la fracción volátil por el solvente y volúmen de la muestra analizada por cromatografía de gases Grosch (1993).

En general, resulta bastante difícil juzgar la relevancia sensorial de los componentes volátiles de un simple análisis de cromatografía olfatométrica; por este motivo, durante los últimos 40 años, se han desarrollado diferentes técnicas para poder estimar la contribución sensorial de un solo componente en el aroma de un alimento. Técnicas de análisis de dilución de un extracto (AEDA) (Ullrich y Grosch, 1987) CharmanAnalysis (Acree *et al.*, 1984) y Osme (McDaniel *et al.*, 1990) son los métodos más empleados en el análisis cromatográfico olfatométrico.

Dos técnicas de dilución de extractos (AEDA y CharmanAnalysis) junto con la técnica Osme han sido desarrolladas para obviar las limitaciones de una simple cromatografía gaseosa olfatométrica.

En la técnica de AEDA el análisis cromatográfico se lleva a cabo con la utilización de un divisor de flujo a la salida de la columna, de tal forma que las muestras son detectadas mediante un detector FID (detector de ionización de llama) y un detector olfatométrico separadamente.

La sucesiva dilución del extracto junto con los análisis cromatográficos de cada una de las diluciones dan lugar a la detección de una de ellas en las que los componentes aromáticos no son percibidos. En base a esto se define el factor de dilución como la relación existente entre la concentración del compuesto en el extracto inicial y el extracto más diluido en el que fue detectado el componente aromático mediante cromatografía gaseosa olfatométrica. Este factor de dilución es una medida relativa al valor de actividad olorífica de un compuesto en el aire. Esta técnica ha resultado ser bastante efectiva en la determinación de la relevancia sensorial de los componentes volátiles en los alimentos (Mistry *et al.*, 1997).

La concentración de un determinado componente puede ser determinada mediante la multiplicación del factor de dilución al cual el componente no es detectado por su concentración umbral.

Otra posibilidad de utilización de esta técnica de dilución es la combinación de la técnica de espacio de cabeza con AEDA. De esta manera se evitan las posibles pérdidas de los componentes más volátiles durante las etapas de concentración y eliminación del disolvente. La técnica ha sido aplicada tanto a nivel de espacio de cabeza estático (Guth y Grosch, 1993, Grosch, 1993; Milo y Grosch, 1995) como espacio de cabeza dinámico (Grosch, 1993), ofreciendo las ventajas de un método de extracción en ausencia de disolvente.

La técnica CharmanAnalysis definida por Acree *et al.* (1984) está también englobada dentro del campo de las técnicas olfatométricas de dilución. El término "Charm" es un acrónimo de "Combined Hedonic Aroma Response Measurements". Definido como un método cualitativo y cuantitativo en el análisis de un efluente en cromatografía de gases y utilizado para medir áreas de picos y descriptores de olores respectivamente. Este método combina el uso de cromatografía de gases/detector de ionización de llama/cromatografía gaseosa olfatométrica, asistido por el uso de un programa informático.

La técnica requiere la preparación de un extracto aromático del componente de interés y la aplicación de diluciones hasta que no sea detectado el componente mediante cromatografía gaseosa olfatométrica. La serie de dilución de los extractos es analizada de forma aleatoria. Una vez que los componentes son separados en la columna cromatográfica se conducen hacia el olfatómetro dentro del cual una corriente de aire húmedo arrastra la muestra hacia la persona que realiza el análisis olfatométrico y este acciona un sistema eléctrico hasta que cambien las características del olor o bien este desaparezca. Los intervalos de tiempo de retención de cada olor son dibujados para producir un pico cuadrado con una altura determinada, de esta forma los cromatogramas están constituidos por la suma de los picos cuadrados producidos en un índice de retención dado de todas las muestras en una serie de dilución, representando los picos frente a un factor de dilución. Las áreas bajo el pico reciben el nombre de Charm, siendo proporcionales a la cantidad de compuesto de olor activo en la muestra más concentrada.

La diferencia principal de interpretación de resultados entre el sistema de AEDA y el CharmanAnalysis es que en este último se cuantifica la duración del olor mediante cromatografía de gases olfatométrica, mientras que en el sistema AEDA únicamente es considerado el máximo valor de la dilución detectado (Mistry, 1997).

McDaniel *et al.* (1990) desarrollan la técnica Osme. Este término deriva de la palabra griega de significado olfato y puede definirse como un bioensayo cuantitativo de detección del olor de un componente eluyendo de un cromatógrafo de gases olfatométrico (Miranda-López, 1990). Consiste, en la preparación de un extracto representativo del olor en estudio. La inyección en un cromatógrafo de gases con sistema de detección químico permite la obtención de un perfil analítico del mismo; posteriormente el final de la columna se conduce hacia una abertura de detección sensorial, en la que el efluente se introduce en

un tubo Venturi de cristal y dirigido hacia la persona que realiza el análisis olfatómico, que estima la intensidad de un compuesto utilizando una escala electrónica tiempo-intensidad y al mismo tiempo describe el olor del eluyente. Los datos obtenidos mediante este método son: tiempo de retención del olor, rangos de intensidad en el tiempo y descriptores correspondientes del olor. Como en el caso de los métodos anteriores, estos tiempos de retención son considerados como índices de retención. En el cromatograma denominado Osmograma quedan representadas las intensidades medias percibidas frente a los índices de retención.

La diferencia existente entre este método y los anteriores es que únicamente una concentración del extracto es valorada, por lo que los resultados obtenidos no están basados en los niveles umbrales de detección.

#### *II.3.4.4.- Nariz electrónica, instrumentos sensoriales que emulan la nariz humana.*

El sistema de nariz electrónica ha sido diseñado para analizar mezclas complejas en estado vapor; lógicamente esta técnica presenta limitaciones ya que su efectividad no puede ser comparada con la de la nariz humana (Hodgins, 1997). Este modelo es análogo al sistema olfatómico humano; consta de un sensor que representa los sensores presentes en la nariz humana, un circuito que imita la conversión de la señal química en eléctrica en el cerebro humano y finalmente un sistema informático que realiza las funciones del cerebro humano.

Este método de identificación de componentes volátiles es complementario a los anteriormente descritos. La técnica generalmente aporta una información comparativa más que cualitativa y cuantitativa, pero no obstante es ideal para un análisis rápido en un control de

calidad de alimentos. Sin embargo, la diferencia fundamental entre la nariz humana y la electrónica es que esta última no puede diferenciar aquellos compuestos que no son aceptables por la nariz humana.

El sistema de cromatografía gaseosa/espectrometría de masas genera una información cualitativa y cuantitativa sobre los compuestos individuales presentes en la fase vapor. No obstante, para poder determinar que tipo de compuestos son importantes en el flavor del alimento se requiere la contribución humana.

#### II.3.4.5.- *Determinación de enantiómeros y su importancia en el aroma de los alimentos.*

Uno de los factores a tener en cuenta en el análisis del aroma de un alimento es la presencia de componentes con comportamiento químico muy similar, por ejemplo, isómeros.

El método más utilizado en la separación de enantiómeros conlleva la interacción de los diastereomorfos con un medio quiral, que se lleva a cabo por la derivatización del analito con un auxiliar quiral, seguido de la separación de los diastereoisómeros en un medio aquiral, por ejemplo medios cromatográficos ó electroforéticos. De igual forma los diastereoisómeros pueden ser disueltos en un disolvente aquiral y analizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Bernreuther *et al.*, 1997).

Las técnicas más utilizadas en el análisis del flavor según lo expresado por Shreider *et al.* (1995), pueden agruparse en: métodos quirópticos, espectrometría magnética nuclear, electroforésis y cromatografía gaseosa.

Existen diferentes métodos quirópticos utilizados en química analítica, tales como la polarimetría, la dispersión óptica rotatoria y métodos basados en la actividad óptica vibracional.

En el pasado la técnica más empleada en el análisis del flavor en moléculas simples y mezclas complejas como aceites esenciales, era la polarimetría. Esta técnica todavía se emplea en el análisis rutinario de la pureza óptica del flavor en compuestos, pero presenta el inconveniente de la necesidad de una gran cantidad de muestra para la corrección de los análisis.

Más recientemente estos métodos quirópticos han sido reemplazados por técnicas cromatográficas. El preciso conocimiento de las relaciones enantioméricas entre los componentes es importante en el conocimiento de la autenticidad de productos alimenticios y aceites esenciales, así como en la preparación de fragancias y perfumes.

El uso de fases estacionarias quirales de elevada pureza ha reemplazado a la conversión de enantiómeros en diastereoisómeros mediante un agente quiral de derivatización.

Un ejemplo característico de la importancia de los enantiómeros en el flavor de los alimentos es el limoneno. El (R)-(+)-limoneno, se encuentra en una concentración superior al 90% en el aceite esencial de naranja, el (S)-(-)-limoneno se encuentra en el aceite de especies de menta y coníferas. El limoneno racémico recibe el nombre de dipenteno. Estos limonenos se emplean en la fabricación de fragancias (Bauer *et al.*, 1990) y la calidad del olor de la composición depende de su composición enantiomérica.

#### II.3.4.6.- *Cromatografía líquida de alta presión*

La aplicación de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para la detección de componentes volátiles en alimentos, ha sido empleada por Kubeczka (1981). El empleo de este sistema en la identificación de los componentes del flavor, permite trabajar a temperatura ambiente sin necesidad de aplicar las altas temperaturas

de la cromatografía gaseosa e impedir una degradación de los productos.

La mayoría de las aplicaciones de estas técnicas han ido destinadas a la determinación de productos naturales lábiles, bioquímicos, farmacéuticos, drogas, tintes, plaguicidas y también alimentos. No obstante, se han observado problemas en su aplicación asociados con la detección de aquellos componentes que se encuentran a baja concentración, especialmente para aquellos productos que no absorban la luz UV.

Lee y Nagy (1990), proponen un nuevo método de cromatografía líquida de alta presión, aplicando para ello la fluorescencia como sistema de detección.

Destacan que el empleo de este sistema en la detección del 4-vinil-guayacol, (componente derivado de la descarboxilación del ácido ferúlico y conocido como causante del desarrollo de olor desagradable en el zumo de naranja), presenta un nivel de sensibilidad superior en 10 o 15 veces al detectado mediante la cromatografía gaseosa.

#### **II.4.- ALTERACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DURANTE EL PROCESADO Y ALMACENAMIENTO**

El propósito de la identificación y cuantificación de los componentes volátiles del zumo es el de conocer su contribución a la calidad del flavor del mismo. Por ello se ha de considerar la contribución individual de un cada componente volátil. Otro problema es que el aroma de la fruta desarrolla cambios desde que es exprimida,

durante el procesamiento del zumo y el almacenamiento (Dürr y Schobinger, 1981).

El zumo de naranja ha sido durante mucho tiempo el más apreciado por el consumidor (Katz y Giese, 1998), siendo uno de los factores que condicionan este hecho la calidad de su fracción aromática (Shaw, 1994). El aroma fresco del zumo de naranja puede ser modificado por los tratamientos a los que queda sometido durante el procesado industrial y/o por las condiciones de almacenamiento (Shaw, 1986).

De esta forma, la degradación del ácido ascórbico, mediante mecanismos de pardeamiento no enzimático, las reacciones de hidratación y deshidratación y otras reacciones químicas, catalizadas en el medio ácido del zumo, son las principales responsables de la pérdida de frescura, color y desarrollo de olores desagradables en los zumos cítricos (Lee y Nagy, 1996).

Estos cambios suponen un grave problema para la calidad del zumo de naranja en el procesamiento de cítricos en la industria (Pino y Durán, 1981).

Para evitar estas alteraciones es necesario desarrollar métodos objetivos y suficientemente sensitivos para la determinación de las reacciones de degradación del zumo durante las diferentes etapas de procesamiento y almacenaje.

Las posibles contribuciones de un sólo volátil a la calidad sensorial del aroma de zumo fresco varía en función de la naturaleza del mismo; por ejemplo, los compuestos terpénicos presentes en la fracción aromática de la fruta fresca que son insaturados fácilmente se oxidan por acción del aire con el desarrollo de olores y sabores desagradables (“off-flavour”).



#### II.4.1.- Alteraciones del aroma durante el procesado industrial

En el procesado industrial el zumo de naranja experimenta cambios que indudablemente causan una alteración en el flavor original del zumo fresco. Para poder entender estos cambios es necesario tener una información cuantitativa sobre los componentes más característicos del aroma de la naranja en ambas modalidades de zumo (zumo fresco y procesado). Tal información permite actuar modificando las condiciones del procesado e incluso, la posible adición de fracciones volátiles recuperadas en algunas de las etapas de tratamiento, para conseguir un perfil aromático en el producto acabado próximo al del zumo fresco (Nisperos-Carriedo y Shaw, 1990). Para esto también han de tenerse en cuenta las proporciones en las que se encuentran los componentes (Shaw, 1979), el valor umbral del sabor (Patton y Jesehpson, 1957), el efecto sinergista entre componentes volátiles (Shaw y Wilson, 1980) y las interacciones de los componentes volátiles con los no volátiles (Ahmed *et al.*, 1978b).

Nisperos-Carriedo y Shaw en 1990, estudian el efecto del procesado industrial sobre los componentes volátiles del zumo de naranja por comparación de la fracción volátil del zumo fresco con la del procesado. Estos autores identifican y cuantifican mediante la técnica de espacio de cabeza 20 componentes volátiles entre los que se encuentran aldehídos, alcoholes, cetonas y ésteres. Sin embargo, no determinan diferencias en cuanto al perfil aromático de los zumos industriales pasteurizados y sin pasteurizar con respecto al zumo fresco, pero si detectan variaciones importantes de concentración en los zumos pasteurizados reconstituidos de zumos concentrados; en ellos observan disminuciones en el contenido de acetaldehído, acetato de metilo, butiratos de metilo y de etilo, frente al incremento de concentración detectado para decanal, octanal y linalol, de menor volatilidad.

Octanal y decanal son aldehídos considerados como importantes contribuyentes al aroma del zumo de naranja (Arctander, 1969, Boelens y van Gemert, 1987) y constituyen estándares de identidad del aceite esencial de naranja. Por el contrario, autores como Ahmed *et al.* (1978a) determinaron que un contenido en decanal superior a 0,72 ppm suponía una contribución negativa a la calidad del zumo de naranja.

Los ésteres identificados, acetato de etilo, butirato de etilo y butirato de metilo también son componentes definitorios de la calidad de la fracción aromática (Arctander, 1969). La pérdida de concentración de estos componentes está asociada a la pérdida de calidad del zumo de naranja.

En general el proceso de pasteurización requiere tratamientos térmicos que modifican el delicado flavor de un zumo fresco (Moshonas *et al.*, 1993). Numerosos autores han intentado definir los cambios sufridos por el flavor del zumo fresco durante el tratamiento térmico al que quedan sometidos (Schreier *et al.*, 1977 y 1979; Schreier, 1981; Nisperos-Carriedo y Shaw, 1990; Moshonas *et al.*, 1993; Fellers y Carter, 1993; Nagy *et al.*, 1989). No obstante, los componentes generados o modificados inmediatamente después del tratamiento térmico han sido difíciles de detectar y los pocos cambios identificados no han sido estudiados por su contribución al flavor del zumo pasteurizado, según Schreier (1981).

Moshonas y Shaw, recientemente (1997), han realizado un estudio comparado del flavor y la composición química del zumo de naranja pasteurizado de la variedad Valencia y el zumo de naranja fresco. La acción del tratamiento térmico sobre los componentes del flavor es más acusada conforme las condiciones de temperatura y tiempo aumentan; por este motivo, estos autores pasteurizan el zumo de naranja fresco bajo condiciones de 98°C -11 segundos (zumo ligeramente pasteurizado) y 98°C-37 segundos (pasteurización alta).

Los resultados de la evaluación sensorial, comparando el zumo fresco con los pasteurizados, muestran la ausencia de diferencias significativas entre el zumo fresco y el ligeramente pasteurizado. Ambos zumos tenían una mejor clasificación hedónica que la correspondiente al zumo tratado a más alta temperatura; a su vez la aplicación del test de diferencias triangulares entre muestras rindió resultados paralelos a los anteriores.

El estudio para determinar los cambios sufridos en la composición química del zumo -responsables de las diferencias de flavor entre el zumo fresco y el altamente pasteurizado- se llevan a cabo mediante la técnica de espacio de cabeza en cromatografía gaseosa. El análisis de las tres muestras no detecta a nivel cualitativo diferencias en composición, pero si a nivel cuantitativo, aunque estas diferencias son escasas y no coincidentes con los cambios causados por el tratamiento térmico.

Otro hecho detectado por estos autores es la existencia de mayores diferencias de concentración entre el zumo fresco y el ligeramente pasteurizado. Estos resultados no ayudan a entender los cambios de flavor detectados a nivel sensorial y plantean el análisis de componentes volátiles totales mediante la extracción con diclorometano y posterior análisis cromatográfico del zumo fresco y el zumo altamente pasteurizado.

Ambos zumos muestran cromatogramas idénticos salvo la excepción de la presencia de un pico cromatográfico distinto a nivel del zumo altamente pasteurizado que identifican como ácido octanóico.

Harrison y Elder, en 1950, determinaron el nivel umbral del flavor para este componente, estableciéndolo en 22,4 ppm. Algunos de los miembros panelistas observaron notas de olor y flavor rancio a niveles de concentración por encima de las 50 ppm, mientras que para concentraciones inferiores sólo se determina un flavor rancio, como si el ácido octanóico enmascarase las notas del flavor deseadas en el zumo control. Estos resultados coinciden con lo expresado por

Arctander (1969), quien expresa que este ácido presenta un olor rancio repulsivo siempre a concentraciones bajas ( $< 0,1 \%$ ), y un flavor y olor rancio cuando las concentraciones quedan por encima de las 50 ppm.

Una de las etapas finales en la elaboración del zumo de naranja es la concentración. Lafuente *et al.* (1980) detectan que durante la concentración por evaporación la mayor parte de los componentes volátiles responsables del aroma típico del zumo de naranja se separan junto con el vapor de agua.

Por ello, para obtener productos de calidad, los aromas eliminados deben restituirse al zumo. En la década de los 40 se desarrolló un procedimiento de aromatización consistente en incorporar al zumo concentrado, de aproximadamente  $60^\circ$  Brix, la cantidad de zumo fresco necesario para obtener una mezcla de  $40-45^\circ$  Brix (McDowel *et al.*, 1948). El producto obtenido de esta forma ("cut-back"), convenientemente conservado por congelación ( $-18^\circ\text{C}$ ), tiene una excelente calidad habiendo alcanzado un alto grado de aceptación comercialmente, pero es evidente que de esta forma se consigue sólo una aromatización parcial.

Posteriormente, el desarrollo de la técnica de concentración con recuperación de aromas en los zumos de frutas ha encontrado una de sus principales aplicaciones en la preparación de los denominados superconcentrados de naranja ( $60-65^\circ$  Brix) que por conveniente dilución en agua permiten obtener zumos reconstituidos cuya aceptación es parangón a la del zumo fresco (Wolford *et al.*, 1968).

En el proceso industrial de recuperación de aromas se diferencian dos etapas fundamentales: la desaromatización del zumo, que se lleva a cabo por la evaporación parcial del mismo y la concentración de la fracción volátil recuperada en la primera etapa por rectificación en columna; de esta forma se obtiene una esencia cuyo contenido en componentes aromáticos es de 100 a 200 veces más alto que el del zumo. La concentración del zumo desaromatizado se completa a parte

hasta el nivel deseado y al zumo concentrado se le añade la esencia que contiene los aromas recuperados. El proceso fue aplicado por primera vez por Milleville y Eskew (1944) al zumo de manzana operando a presión atmosférica.

Para productos muy termosensibles, como el zumo de naranja, se han desarrollado sistemas de recuperación de aromas que operan a presión reducida. Estos métodos, presentan, no obstante, ciertos inconvenientes entre los que cabe destacar la necesidad de utilizar instalaciones de mayor tamaño, debido al aumento del volumen de los vapores por la menor presión de trabajo y las inevitables pérdidas de componentes volátiles, arrastrados por los gases incondensables, a través de la bomba de vacío (Mannheim y Passy, 1975).

Peleg y Mannheim (1973) han estudiado el efecto de las variables del proceso de recuperación de aromas del zumo de naranja empleando el sistema WURVAC, que opera a vacío y recurre al arrastre con nitrógeno para facilitar la separación de los componentes volátiles en la columna de rectificación.

En el estudio de las condiciones de desaromatización del zumo se experimentan como variables la temperatura de precalentamiento, la de evaporación y la proporción de agua eliminada. Está comprobado que la efectividad de la desaromatización aumenta con la proporción de agua evaporada para cualquier combinación de temperatura de precalentamiento- evaporación ensayadas. Al aplicar un precalentamiento de 110°C se observa que al reducir la temperatura de evaporación, como consecuencia de aplicar mayor vacío, se logra una mejora en la eliminación de las sustancias volátiles reductoras.

La temperatura de precalentamiento produce un efecto importante sobre la desaromatización. Para una temperatura de evaporación de 25°C si se precalienta el zumo se elimina menor cantidad de sustancias volátiles totales que mediante precalentamiento a 110°C (con un 16,4% de agua evaporada se logra eliminar el 68,3% de volátiles, mientras que con el 18% de evaporación tan solo se consigue eliminar el

58,5%). En cuanto a la fracción volátil hidrosoluble, que contribuye de forma importante a la frescura del zumo se obtienen grados de eliminación que siguen las mismas pautas que las sustancias volátiles reductoras.

Otro factor importante a tener en cuenta durante el procesamiento del jugo es el efecto de la ultrafiltración (Hernández *et al.*, 1992). Esta técnica se puede emplear para clarificar el zumo o como un paso anterior para la eliminación de sabores amargos de naranja Navel y pomelo con resinas de adsorción (Wethern, 1991) para facilitar el flujo del líquido a través de la columna de adsorción. Este proceso también se emplea como paso anterior a la concentración por ósmosis inversa. La eliminación de sólidos suspendidos permite por concentración del zumo de naranja niveles de 42° Brix (Cross, 1989).

Koseoglu *et al.* (1990) estudiaron el uso de membranas en el procesamiento de cítricos y observaron cambios en la composición del zumo de naranja y pomelo después de la ultrafiltración.

Los cromatogramas del espacio de cabeza de permeado y retenido muestran que algunos compuestos aromáticos en el jugo son retenidos en la pulpa durante el proceso de ultrafiltración. La mayoría de los compuestos solubles en agua, aldehidos ésteres y alcoholes, pasan a través de la membrana; los menos polares, tales como limoneno y valenceno, tienden a permanecer en el retentado, tal como se muestra en la Tabla II.4.-1. Este efecto resulta más pronunciado en el limoneno, donde menos del 5% se encontró en el permeado. El mismo caso fue encontrado con el valenceno y el  $\alpha$ -pineno. El cromatograma de zumo fresco fue similar al del retenido excepto por la menor concentración de compuestos hidrofóbicos.

La distribución de los componentes del aroma durante la ultrafiltración es un factor importante cuando el permeado y el retenido han de ser sometidos separadamente a diferentes tratamientos consecutivos, como por ejemplo, desamargado o procesos de calentamiento.

Tabla II.4.-1.- **DISTRIBUCIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES  
EN ULTRAFILTRACIÓN DEL ZUMO DE NARANJA FRESCO**

<b>Componentes</b>	<b>Zumo fresco (ppm)</b>	<b>Zumo permeado (ppm)</b>	<b>Zumo retenido (ppm)</b>
<b>Acetaldehido</b>	11,90 ± 0,18	11,30 ± 1,30	12,40 ± 1,47
<b>Hexanal</b>	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01
<b>Octanal</b>	0,78 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,08 ± 0,04
<b>Decanal</b>	0,61 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,78 ± 0,02
<b>Butirato de etilo</b>	0,54 ± 0,01	0,56 ± 0,07	0,53 ± 0,01
<b>Hexanoato de etilo</b>	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,03 ± 0,01
<b>Metanol</b>	26,00 ± 4,80	16,00 ± 0,26	47,00 ± 4,80
<b>Etanol</b>	515,00 ± 81,1	366,00 ± 69,60	526,00 ± 60,20
<b>Linalol</b>	0,68 ± 0,02	0,85 ± 0,06	0,71 ± 0,02
<b>Limoneno</b>	106,00 ± 8,60	7,50 ± 0,94	161,00 ± 8,30
<b>α-Pineno</b>	1,00 ± 0,07	0,25 ± 0,06	1,80 ± 0,07
<b>Valenceno</b>	3,60 ± 0,37	1,20 ± 0,10	5,40 ± 0,21

Koseoglu *et al.*, (1990)

#### **II.4.2.- Alteraciones del aroma durante el almacenamiento**

En el estudio del efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la fracción aromática del zumo de naranja se han de considerar tanto las condiciones de almacenaje del fruto como del zumo, ya que ambos en condiciones usuales de trabajo son almacenados previamente a su utilización.

Los frutos cítricos una vez cosechados sufren pérdidas de peso por respiración y progresivas deterioraciones, como consecuencia de acciones bacterianas y fúngicas y según las condiciones de temperatura y humedad del ambiente. Tales efectos perjudican enormemente al sabor, aroma y apariencia del producto y son responsables a veces de sustanciosas pérdidas económicas.

Diferentes técnicas han sido diseñadas para prevenir estos cambios y deterioros, tales como almacenamiento frigorífico en atmósfera controlada y almacenamiento hipobárico (Grierson y Ben-Yeshohua, 1986), aunque estos métodos resultan muy costosos. Un sistema alternativo o complementario es la aplicación de ceras y otras capas protectoras y contenedores (Kester y Fennema, 1986).

Con relación a esta problemática, Nisperos-Carriedo *et al.* (1990) estudian los cambios sufridos en los componentes volátiles constituyentes del flavor del zumo de naranja por la aplicación de cinco lípidos y materiales envolventes del fruto antes de su utilización en fábrica. El estudio se lleva a cabo durante dos días a la temperatura de 21°C. Utilizando la técnica de espacio de cabeza identifican 15 componentes característicos del zumo de naranja y presentes en ambos tipos de zumo, el procedente de la naranja recubierta y el de la naranja testigo sin recubrir. Los resultados obtenidos detallan que para aquellos frutos sin recubrir se detecta un ligero crecimiento de metanol, etanol, acetaldehído, hexanol y cis-3-hexenol, frente al aumento considerable en la fruta recubierta del acetaldehído, acetato de etilo y



butiratos de etilo y metilo, componentes característicos del aroma fresco de la naranja.

Una vez el zumo ha sido procesado las modificaciones químicas acaecidas durante el almacenamiento se deben fundamentalmente a la presencia de derivados furánicos, ácidos hidroxicinámicos y otros productos derivados por transformaciones de los componentes del aceite esencial incorporados durante el procesado industrial.

Los derivados de los furanos han sido identificados como productos de degradación asociados con el pardeamiento en productos cítricos; desde el punto de vista sensorial contribuyen al aroma y están principalmente asociados con el olor dulce, frutal, acaramelado,... Aparentemente determinan el pardeamiento desarrollado durante el almacenamiento, siendo furfural e hidroximetilfurfural los dos derivados más abundantes en los zumos cítricos.

El furfural es el componente más utilizado como indicador de la calidad del zumo, ya que su contenido en el zumo fresco y procesado puede ser considerado nulo frente a las cantidades detectadas en los zumos con un almacenamiento prolongado (Nagy y Randall, 1973). Este componente proviene de la degradación anaeróbica del ácido ascórbico, no estando relacionado con el desarrollo del olor de los zumos envejecidos, sino como indicador de un tratamiento térmico excesivo (Maraulja, *et al.*, 1973), ya que el valor umbral de detección del furfural en zumo de naranja es aproximadamente de 80 ppm, y este valor es bastante más elevado que el que puede ser detectado en un zumo envejecido; legislativamente su contenido es mucho más bajo.

El hidroximetilfurfural, es un aldehído cíclico formado por la deshidratación en medio ácido de hexosas cuando son sometidas a elevadas temperaturas. Siempre en condiciones de fabricación higiénicas un elevado contenido en este compuesto indica un excesivo tratamiento térmico durante la concentración o la pasteurización (Lee y Nagy, 1996). Este componente es considerado como un precursor del

pardeamiento en los zumos cítricos y está relacionado con la pérdida del color de los mismos.

En los zumos de frutas la concentración y tipo de azúcares, la cantidad y estructura de los aminoácidos, pH, así como empaquetado, almacenamiento y las reacciones con otros compuestos pueden llegar a afectar a la producción de hidroximetilfurfural durante el procesamiento y el almacenamiento de los zumos de frutas.

Lee y Nagy en 1988, detectan en el zumo de pomelo envasado en botes de cristal y enlatado un aumento considerable del contenido en hidroximetilfurfural, siendo función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Así mismo, estos autores, en 1996, estudiaron el crecimiento gradual de la concentración de este componente sobre zumo de naranja concentrado y almacenado a temperaturas de 5 y 24°C. El contenido inicial de hidroximetilfurfural era de 0,03 ppm, detectándose en el zumo almacenado durante 22 semanas a 24°C un aumento de la concentración alcanzando 3 ppm, frente a 0,2 ppm detectadas en el zumo almacenado a 5°C.

En el caso del zumo de naranja un contenido elevado en hidroximetilfurfural se relaciona con su pardeamiento (Lee y Nagy, 1988), pero no con modificaciones sensoriales (Goldenbergm, *et al.*, 1994).

Los ácidos hidroxicinámicos entre los que se encuentran el para-cumárico, ferúlico, caféico y sináptico y sus formas complejas son detectados en los frutos cítricos (Naim, *et al.*, 1992).

Durante el procesamiento y almacenaje de los zumos cítricos, la descarboxilación catalítica en medio ácido de los ácidos hidroxicinámicos conducen a la formación de vinil-fenoles; así la descarboxilación del ácido p-cumárico produce p-vinil-fenol, la del ácido ferúlico, p-vinil-guayacol, dos derivados que han sido detectados por

Lee y Nagy (1996) en los zumos cítricos procesados. Los vinil-fenoles son compuestos de olor desagradable con un umbral de detección bastante pequeño, llegando su presencia a afectar a la aceptabilidad del zumo cítrico.

El 4-vinil-guayacol, ha sido detectado como el componente más detrimente en el flavor de los zumos de naranja enlatados (Tatum *et al.*, 1975). Este componente imparte al zumo de naranja olor a envejecido o podrido a niveles de 0,075 ppm. Estos autores estudian la degradación de los productos formados en zumo de naranja enlatado durante el almacenamiento, detectando la presencia de diez compuestos de degradación formados durante doce semanas de almacenamiento a 35°C. Tres de estos compuestos  $\alpha$ -terpineol, 2,5-dimetil-4-hidroxy-3 (2H)-furanona y 4-vinil guayacol mostraron propiedades de contribución sensorial negativas. Un panel entrenado de catadores afirma que 4-vinil guayacol cuando es adicionado al zumo control imparte una característica de zumo envejecido, frente a la adición de  $\alpha$ -terpineol, 2,5-dimetil-4-hidroxy-3 (2H)-furanona que aportan su olor característico pero en ninguna medida comparable al del 4-vinil guayacol.

La detección del 4-vinil-guayacol, puede ser un buen indicador de la descarboxilación de compuestos fenólicos durante el procesamiento térmico y el almacenaje, y puede informar más allá de su influencia en el desarrollo del flavor desagradable de los zumos cítricos. No obstante, la eficacia de este componente como indicador de la degradación cualitativa de los zumos no es adecuada ya que, según lo expresado por Naim *et al.* en 1988, solamente trazas de este componente son detectadas en el zumo de naranja por la degradación del ácido ferúlico, cuando el pardeamiento no enzimático en el zumo ya es evidente. Estos autores también aseguran que este componente se degrada de forma significativa durante el almacenaje prolongado a elevadas temperaturas. Lee y Nagy en 1990, estudian la formación y degradación de este componente destacando que aumenta su

concentración en el tiempo a elevadas temperaturas de almacenamiento, seguido de una disminución cuando la temperatura alcanza los 50°C. Esto es debido a que el 4-vinil-guayacol actúa como sustrato de conversión en otros derivados fenólicos o bien este componente se polimeriza dando lugar a la formación de oligómeros.

La presencia de aceites esenciales en los zumos cítricos contribuye a mejorar los aromas y el sabor de estos productos, no obstante bajo condiciones inadecuadas de procesamiento, almacenaje y empaquetado algunos de estos componentes se degradan dando lugar a la aparición de sustancias que aportan un flavor no deseado (Lee y Nagy 1996). Estas reacciones de degradación en su mayoría son catálisis ácidas en medio acuoso en las que tienen lugar reacciones de hidratación, deshidratación, ciclaciones e hidrólisis (Clark y Chamblee, 1992). Los compuestos oxigenados así formados proceden de reacciones de adición química de moléculas de agua, no por reacciones de oxidación debidas al oxígeno disuelto en el medio de reacción. En la Tabla II.4.2.-1 quedan esquematizados los compuestos degradados térmicamente derivados de los constituyentes del aceite esencial según lo expresado por Lee y Nagy en 1996.

Tabla II.4.2.-1- **COMPONENTES DERIVADOS POR DEGRADACIÓN TÉRMICA DE LOS CONSTITUYENTES DEL ACEITE ESENCIAL DE CITRICOS**

PRECURSOR	COMPUESTO DERIVADO	FLAVOR
d-Limoneno	$\alpha$ -Terpineol	Rancio, envejecido, pino
Linalol	$\alpha$ -Terpineol	Rancio, envejecido, pino
	Nerol	Dulce, rosa, frutal
	Geraniol	Dulce, rosa floral
$\alpha$ -Terpineol	cis-1,8-mentanediol	Dulce, canfor
Cis-1,8-p-mentanediol	1,8-cineol	Pungente, canfor
	1,4-cineol	
Citral	p-menta-1,5-dien-8-ol	no caracterizado
	p-menta-1(7), 2-dien-8-ol	no caracterizado
	cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	no caracterizado
	trans-p-menta-2,8-dien-1-ol	no caracterizado
p-menta-1,5-dien-8-ol	p-cimen-8-ol	Flavor desagradable no especificado
p-menta-1(7), 2-dien-8-ol	p-cimeno	Flavor desagradable terpénico
	$\alpha$ ,p-dimetilestireno	Flavor desagradable terpénico
$\gamma$ -Terpineno	p-cimeno	Flavor desagradable terpénico

(Lee y Nagy 1996)

El  $\alpha$ -terpineol es un compuesto derivado de la degradación de algunos componentes presentes en el aceite esencial, caracterizado por impartir flavor desagradable descrito como tipo terpénico, canforoso, rancio y pungente.

Durante el almacenamiento del zumo de naranja empaquetado autores como Durr *et al.* (1981) destacan la disminución progresiva del contenido en limoneno, linalol, neral, geranial, octanal y decanal y el aumento progresivo de un componente con flavor desagradable, el  $\alpha$ -terpineol. Tatum *et al.* (1975), mostraron que la adición de una pequeña cantidad (2,5 ppm) de  $\alpha$ -terpineol al zumo fresco recién exprimido causaba el desarrollo de un flavor rancio y envejecido.

Moshonas y Shaw, (1989) estudiaron la evolución de 29 componentes volátiles en zumo de naranja empaquetado durante un periodo de 8 meses de almacenamiento, encontrando un decrecimiento en la concentración de componentes entre los que destacan, 1-penten-3-ona, hexanal, butirato de etilo, octanal, neral y geranial, frente al crecimiento de la concentración de  $\alpha$ -terpineol y furfural. Un panel de expertos catadores observa en estos zumos un flavor rancio y envejecido comparado con el zumo procesado sometido a tratamientos térmicos.

El desarrollo de flavor desagradable en los zumos de naranja es atribuido a las pérdidas de los ésteres de mayor volatilidad (Blair *et al.*, 1952) y a la aparición del  $\alpha$ -terpineol durante el almacenamiento, quedando el contenido de este componente más afectado por la temperatura de almacenamiento que por el contenido inicial de limoneno en el zumo (Durr *et al.*, 1981).

A nivel cualitativo las pérdidas en los zumos cítricos procesados son debidas principalmente al pardeamiento no enzimático y a la degradación del flavor. Factores como temperatura y tiempo de almacenaje, niveles de oxígeno en el zumo, variedad de zumo (simple, concentrado y diluido) y el tipo de material empleado en el empaquetado, afectan a la calidad final del zumo. La degradación térmica inducida de azúcares y del ácido ascórbico conduce a la

aparición de flavor desagradable y al pardeamiento no enzimático del zumo (Lee y Nagy, 1988 a).

En la Tabla II.4.2.-2., se detalla una lista de la descripción del flavor de algunos azúcares degradados detectados en zumos cítricos según lo expresado por Rousell *et al.* (1992). Estos autores destacan que furanonas y piranonas (compuestos heterocíclicos oxigenados) están asociadas con la nota de flavor caramelizado del zumo cítrico. Tanto el furfural como el hidroximetilfurfural son los dos derivados de los furanos más comúnmente detectados y están considerados como indicadores de tratamientos térmicos abusivos y pardeamientos.

El ácido ascórbico es uno de los principales nutrientes en zumos cítricos, no obstante bajo condiciones adversas de procesamiento y de almacenamiento, esta vitamina se degrada dando lugar a la aparición de flavor desagradable y compuestos característicos del pardeamiento (Tatum *et al.*, 1969).

La velocidad de degradación de este ácido está relacionada con el contenido en sólidos solubles (°Brix) del zumo y la temperatura de almacenamiento. Otros factores de menor influencia, tales como el pH, presencia de iones metálicos y oxígeno libre (en el espacio de cabeza del contenedor y el disuelto en el zumo) son también considerados (Kanner y Shapira, 1989). La degradación del ácido ascórbico tiene lugar en los zumos cítricos por mecanismos oxidativos y no oxidativos. La velocidad de degradación mediante mecanismo no oxidativo es diez veces inferior a la degradación en condiciones aeróbicas (Kefford *et al.*, 1959).

Tabla II.4.2.2.- DESCRIPCIÓN DEL FLAVOR DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE AZUCARES ASOCIADOS CON EL PARDEAMIENTO.

CONSTITUYENTE	DESCRIPCIÓN DEL FLAVOR
<b>FURANOS</b>	
2-Hidroxiacetil-1-furan	Quemado, dulzón
Furfural	Pan dulce, acaramelado
5-hidroximetil furfural	Dulce, herbáceo
2-Acetil furan	Quemado, dulzón, cetónico
2-Acetil-3-hidroxifuran	Dulce, frutal-acaramelado
Acido 2-furóico	Ligeramente acaramelado
5-Metil-2 furfural	Nota de uva ácida
<b>FURANONAS</b>	
2,5-dimetil-4-hydroxi-(2h)-furanona	Dulce, quemado, olor a piña/fresa
Dihidro-2(3h)-furanona	Dulce, ligeramente sabor caramelizado
5-Metil-2(5H)-furanona	Intensamente dulce-herbáceo, también próximo a tabaco
<b>PYRANONAS</b>	
2,3-dihidro-3,5-dihydroxy-6-metil-4H-piran-4-ona	Nota caramelizada

Rousell *et al.* (1992)

Bajo condiciones aeróbicas este ácido se descompone en 2,5-dihidro-2-furanóico, 3-desoxi-D-pentosa, dióxido de carbono y furfural (Kurata y Sakurai, 1967).

Vélez *et al.* (1988), estudian la modificación del zumo de naranja envasado asépticamente durante 1, 2 y 3 meses de almacenamiento a 0, 20 y 37°C. Realizan una evaluación sensorial mediante análisis de



proximidades; para este propósito utilizan dos técnicas de análisis sensorial, una la evaluación de la similaridad-disimilaridad del aroma de las muestras y otra la evaluación de la calidad del aroma en cada una de ellas. En el análisis de proximidades destacan que la distancia entre el aroma de la muestra testigo y de la conservada durante un mes a 0°C es muy pequeña. Pero globalmente se pueden formar tres grupos con las diez muestras analizadas, el primero constituido por la muestra testigo, las tres muestras conservadas a 0°C durante 1, 2 y 3 meses y la muestra conservada durante 1 mes a 20°C; el segundo formado por las muestras almacenadas a 20°C durante 2 y 3 meses y el tercero con las muestras conservadas a 37°C durante 1, 2 y 3 meses. Considerando por separado los efectos de la temperatura y el tiempo sobre la calidad de del aroma en zumos, observan que esta disminuye con más rapidez durante el primer mes de almacenamiento y que las diferencias de calidad entre los zumos almacenados a 20 y 37°C son mayores que las que existen entre los almacenados a 0 y 20°C.

Este mismo efecto ha sido estudiado posteriormente por Tonder *et al.* (1998) quienes establecen las diferencias en composición aromática entre zumos reconstituidos de naranja almacenados a 5°C durante un periodo inferior a 2 semanas y zumos reconstituidos almacenados a 20°C de 9 a 12 meses. Para ello contrastan la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas con la cromatografía gaseosa olfatométrica, empleando para ello un panel de cinco jueces.

En el análisis cromatográfico de identificación y cuantificación, fueron detectadas diferencias significativas para la mayoría de los componentes analizados. En general, las concentraciones fueron superiores en el zumo fresco, con excepción de ácido acético,  $\alpha$  y  $\beta$ -terpineol. Una concentración elevada de estos dos últimos componentes está asociada a la degradación del limoneno (Clark y Chamblee, 1992). En el zumo fresco los componentes más abundantes

detectados fueron: limoneno, octanal, nonanal, linalol,  $\alpha$ -pineno  $\beta$ -mirceno, butanoato de etilo y hexanal. En el zumo almacenado a temperatura ambiente los componentes mayoritarios fueron: limoneno,  $\beta$ -mirceno, linalol,  $\alpha$ -pineno y  $\alpha$ -terpineol.

La comparación de resultados entre la determinación cuantitativa y la olfatométrica muestra similitudes tales como la disminución en concentración con el almacenamiento de  $\beta$ -pineno y octanal; así mismo,  $\alpha$ -pineno, butanoato de etilo y linalol también merman su contenido, pero no son detectadas diferencias significativas entre ambos métodos. Tampoco se detectan con el incremento en concentración del ácido acético y del  $\alpha$ -terpineol. Ambos métodos coinciden en la importancia de butanoato de etilo, limoneno, octanal y linalol en la calidad del aroma en zumo de naranja. Destacan la importancia del ácido acético y butanóico en el análisis olfatométrico, cuando siempre se pensó que su contribución al aroma era prácticamente nula. La explicación a este hecho se basa en que la evaluación de la importancia de un compuesto aromático está centrada en su nivel umbral de detección en el aire y el agua.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**



### **III.1.- ZUMO DE NARANJA**

Las muestras de zumo de naranja, estudiadas en las diversas experiencias de esta memoria de Tesis, han sido recogidas en empresas productoras de derivados de cítricos -zumos y aceites esenciales, principalmente- ubicadas en la Región de Murcia. En las muestras procedentes de frutos, se recurre a la obtención del zumo por exprimido manual en el laboratorio, siendo los frutos frescos recogidos en los silos de alimentación a fábrica representativos en cada una de las series de muestras estudiadas.

Las características físico-químicas de los zumos de naranja procesados industrialmente durante los meses de enero abril y mayo, dentro del periodo de transformación de naranjas de la campaña 1996-97, quedan incluidas en los valores recogidos en la siguiente Tabla III.1.-1.

**Tabla III.1.-.1.- PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DEL ZUMO DE NARANJA PROCESADO**

	<b>ENERO</b>	<b>ABRIL</b>	<b>MAYO</b>
<b>°BRIX LECT.</b>	11,92 ± 0,20	11,90 ± 0,14	11,83 ± 0,16
<b>°BRIX CORREG.</b>	12,09 ± 0,21	12,07 ± 0,14	12,05 ± 0,26
<b>ACIDEZ (%)</b>	0,86 ± 0,05	0,88 ± 0,05	0,87 ± 0,05
<b>RATIO</b>	14,38 ± 1,42	13,65 ± 0,87	13,68 ± 0,75
<b>PULPA (%)</b>	7,94 ± 0,99	9,29 ± 1,57	10,18 ± 1,07
<b>ACEITE (%)</b>	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,03	0,02 ± 0,02
<b>PH</b>	3,58 ± 0,13	3,53 ± 0,08	3,61 ± 0,07

### **III.2.- TOMA DE MUESTRAS**

Tal como se expone en el proceso de extracción y tratamientos industriales del zumo de naranja, de acuerdo con el objeto de este trabajo de investigación, las diferentes tomas de muestras se realizan en distintos puntos de la cadena de elaboración del zumo, en los que se definen claramente las características aromáticas del zumo procedente del fruto y del zumo industrial, así como por el efecto de las distintas etapas del procesado sobre la fracción aromática del mismo.

Las muestras seleccionadas para el estudio, que aparecen señaladas con asterisco en el diagrama del proceso industrial de la Figura I.2.-1 son, de acuerdo con la secuencia de elaboración, las siguientes:

- 1.- Naranja (Fruto para exprimir en laboratorio).
- 2.- Zumo refinado (8-15% S.I.).
- 3.- Zumo centrifugado (< 3% S.I.).
- 4.- Pulpa fina (procedente de la centrifuga).
- 5.- Zumo desaireado.
- 6.- Zumo pasteurizado.
- 7.-. Pulpa gruesa.

En esta memoria se han llevado a cabo estudios de recuperación de los constituyentes volátiles totales del zumo de naranja mediante destilación-extracción simultánea para su posterior análisis cromatográfico, con vistas al conocimiento cualitativo y cuantitativo de los componentes aromáticos presentes en los zumos analizados y microextracción en fase sólida de los volátiles a partir del espacio de cabeza, para determinar la composición de los vapores aromáticos en equilibrio con el zumo.

### **III.3.- EXTRACCIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES**

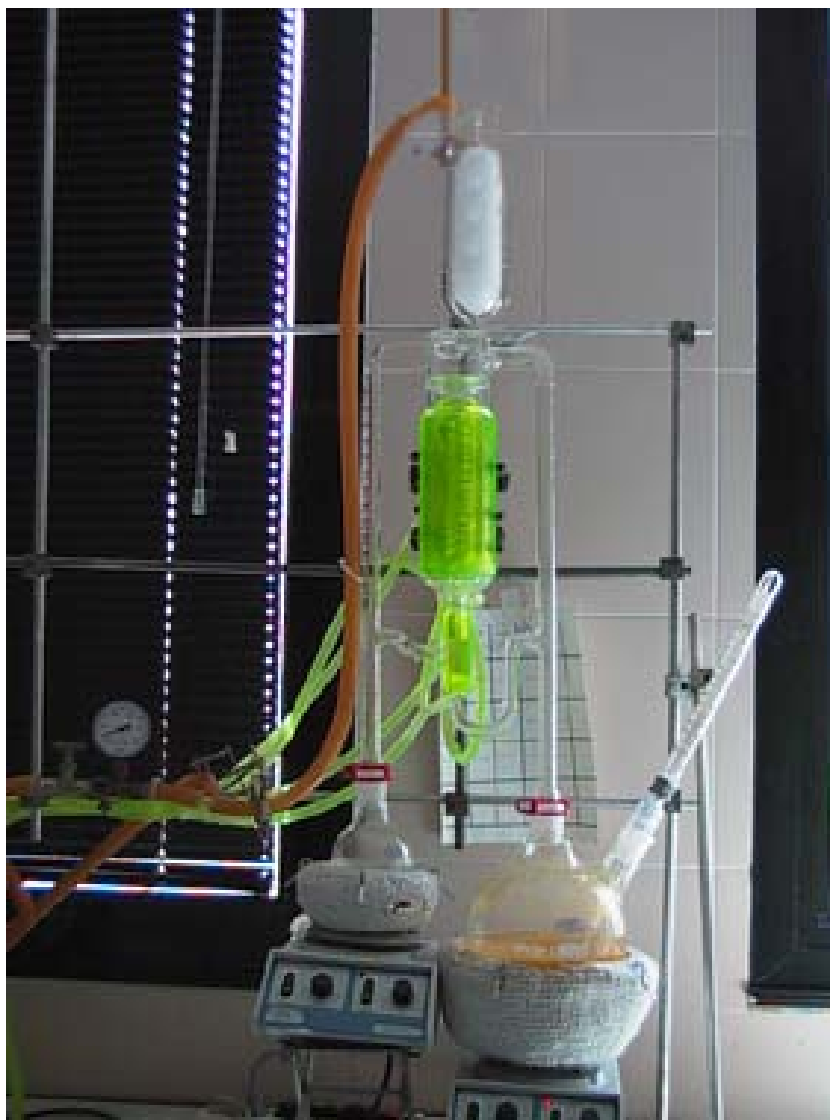
El resultado del análisis de los constituyentes volátiles presentes en cualquier alimento -responsables principales de las características organolépticas del aroma del mismo- depende, ante todo, del método que se aplique en la recuperación de la fracción aromática, obteniendo diferentes resultados debido a la mayor o menor efectividad del método en la recuperación del extracto aromático final, lo más representativo de la composición de la muestra inicial.

#### **III.3.1.- Destilación-extracción simultánea.**

El aislamiento de los volátiles totales presentes en las muestras de zumo analizadas se realiza mediante el empleo del sistema de destilación-extracción simultánea (SDE) inicialmente diseñado por Lickens y Nickerson en 1964 para extracción de volátiles de cerveza. Este método emplea disolventes de muy bajo punto de ebullición para la concentración de los constituyentes volátiles aromáticos. El vapor de agua condensado es extraído por el vapor del disolvente condensado en continuo, trabajando a baja temperatura bajo presión reducida para prevenir el daño térmico y la generación de artefactos.

En nuestro caso el sistema adoptado para trabajar presenta modificaciones, tales como la introducción de una trampa de frío con hielo seco y la aplicación de alto vacío, que mejoran altamente el rendimiento de la destilación, como consecuencia de la aplicación de menor temperatura en la destilación y la menor pérdida de los componentes más volátiles, por efecto del mayor vacío aplicado (Figura III.3.-1.)





**Fig. III.3.-1.- SISTEMA DE DESTILACION-EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA**

El modelo utilizado está diseñado para trabajar con disolventes de menor densidad que el agua, empleando 50 mL de n-hexano (SupraSolv Merck) como agente extractante. Con este dispositivo se consigue recuperar los constituyentes volátiles del zumo a temperaturas entre 42° y 45 °C, mediante la aplicación de vacío comprendido entre 38 y 76 mm de Hg, durante dos horas y media de destilación continuada.

En la valoración cuantitativa de los constituyentes volátiles se recurre a la utilización de un patrón interno, que se adiciona en la muestra inicial, para controlar posibles pérdidas y desviaciones a lo largo de todo el proceso analítico. Se selecciona la ciclohexanona (99,8 % de pureza. Acros Organics. USA) por sus características frente al amplio margen de propiedades de los componentes aromáticos procedentes de los zumos de naranja, distintas en cuanto a polaridad y volatilidad. Se destilan muestras de zumo de naranja con un volúmen aproximado de un litro, con el fin de expresar los resultados en unidades de peso, se recurre a la pesada de las mismas, en el caso de muestras de pulpa gruesa se emplean 500 g. La cantidad de ciclohexanona adicionada a la muestra inicial es de 25 mL de una emulsión acuosa a la concentración de 150 ppm.

### **III.3.2.- Concentración de componentes volátiles**

La siguiente etapa en la determinación es la concentración de los componentes volátiles extraídos en la fase orgánica. Para ello se emplea un sistema de destilación con rectificación. Sistema provisto de una columna de rectificación tipo Vigreux (Vidra-Foc E-19874), intercalada entre el hervidor y el condensador, que permite realizar evaporaciones y condensaciones sucesivas en una misma unidad y en el que parte del

vapor es condensado y devuelto como líquido al destilador (Figura III.3.-2.).

De esta forma conseguimos separar el hexano como componente más volátil, quedando concentrados en el hervidor los componentes volátiles de la muestra que deseamos determinar. La operación se lleva a cabo con aplicación de vacío para impedir un exceso de temperatura, (aproximadamente 35-36°C) que altere la composición de la fracción aromática. La concentración se realiza hasta alcanzar un volumen final de concentrado próximo a los 2 mL.

#### **III.4.- COMPONENTES VOLÁTILES EN ESPACIO DE CABEZA. MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA.**

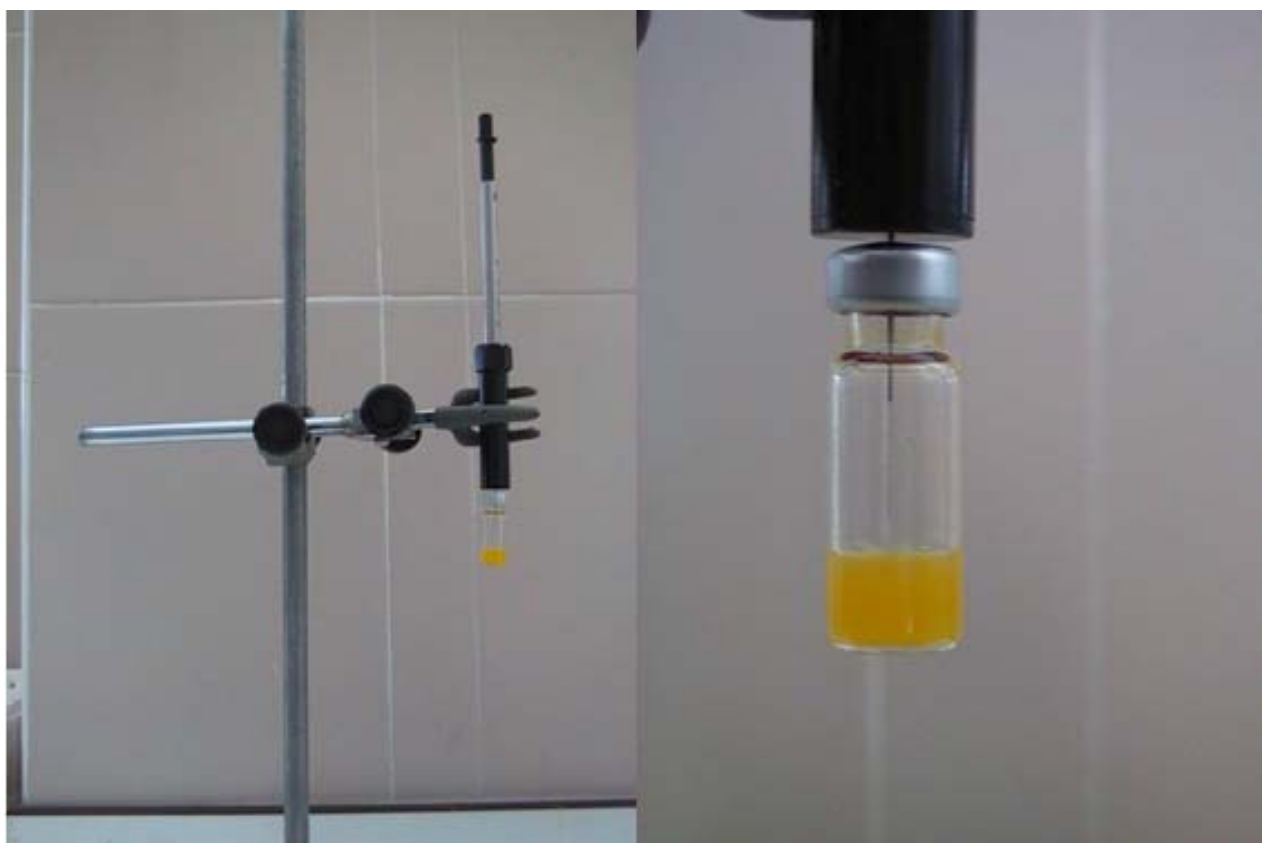
Los constituyentes volátiles en el espacio de cabeza del zumo de naranja se recuperan mediante la técnica de microextracción en fase sólida (SPME), ampliamente desarrollada por Pawliszyn y colaboradores para la extracción de compuestos orgánicos volátiles en disolución (Arthur y Pawliszyn, 1990; Zhang y Pawliszyn, 1993), y especialmente aplicada al análisis de aromas en alimentos (Verhoeven *et al.*, 1992 y Steffen y Pawliszyn, 1996).

Este sistema comercialmente introducido por Supelco Inc. (Bellefonte, PA, USA) como una técnica de extracción selectiva de compuestos orgánicos volátiles en disolución acuosa, en la que los analitos son adsorbidos directamente del espacio de cabeza de la muestra sobre la superficie de una fase estacionaria adecuada y específica según la naturaleza -tamaño molecular y polaridad- de los componentes en estudio, soportada en una fibra de silica gel fundida (Woolley y Mani, 1994), como puede apreciarse en la Figura III.4-1.



**Fig. III.3.-2.- SISTEMA DE DESTILACIÓN CON RECTIFICACIÓN**





**Fig. III.4.-1.- SISTEMA DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**



La muestra se introduce en el interior de un vial provisto de un cierre con septum, de tal manera que cuando la fibra es insertada a través del septum en el espacio de cabeza del vial, existe una transferencia de analitos desde la muestra acuosa hacia el espacio de cabeza y a su vez hacia la superficie de la fibra, hasta alcanzar un equilibrio químico entre las tres fases. El tiempo transcurrido desde la introducción de la fibra en el espacio de cabeza hasta alcanzar el equilibrio químico en las tres fases mencionadas es considerado como el tiempo de equilibrio; a partir de este momento la fibra puede ser transferida directamente a la puerta de inyección de un cromatógrafo de gases para el desarrollo cromatográfico que permita la identificación y valoración cuantitativa de los compuestos adsorbidos en la fibra.

De acuerdo con las características de los componentes a analizar, en este trabajo se han utilizado dos tipos de fibra: una recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS), de 100 $\mu$ m de espesor y naturaleza apolar específica para volátiles de bajo peso molecular y otra recubierta con poliacrilato (PA), de 85 $\mu$ m de espesor y de característica polar y específica para extraer componentes muy polares de muestras de estas características.

Previamente a la utilización, las fibras han de ser acondicionadas mediante su introducción en la puerta de inyección del cromatógrafo de gases a una temperatura de 250 °C, durante 3 y 5 horas para PDMS y PA respectivamente, con el fin de eliminar posibles interferentes procedentes del recubrimiento protector de la fibra.



### III.4.1.- Optimización de la extracción

Para mejorar la efectividad de la técnica se han tenido en cuenta factores como el efecto de la temperatura, el aumento de la fuerza iónica de la muestra y la agitación de la misma durante la exposición de la fibra en espacio de cabeza.

En el estudio han sido elegidos quince patrones de componentes volátiles (Acros Organics. USA), característicos del aroma del zumo de naranja y representativos por su polaridad y volatilidad del conjunto de componentes analizados. Estos componentes, en disolución acuosa a una concentración de 1 ppm, agrupados funcionalmente corresponden a:

**Terpenos:** Mirceno, Limoneno, Valenceno.

**Alcoholes:** Etanol, Linalol, Dodecanol.

**Aldehidos:** Acetaldehido, Decanal, Dodecanal.

**Cetonas:** Acetona, Etil-vinil-cetona, Carvona.

**Ésteres:** Acetato de etilo, Acetato de octilo, Acetato de geranilo.

Refiriendo al 100% la cantidad retenida en ausencia de modificaciones, la comparación de las áreas obtenidas para cada uno de los componentes analizados, nos expresa las variaciones como el tanto por ciento de adsorción en cada uno de los ensayos de los diferentes parámetros que se estudian: temperatura, adición de sal y agitación de la muestra.

#### III.4.1.1.-*Aumento de la temperatura*

En condiciones normales un aumento de la temperatura en la matriz acuosa favorece el enriquecimiento de componentes volátiles en el espacio de cabeza. De esta forma se consigue aumentar en gran medida la difusión hacia el espacio de cabeza de los componentes de menor volatilidad, tal es el caso de los hidrocarburos poliaromáticos como el valenceno, componente característico en el aceite esencial de naranja.

Introducimos el vial con 500  $\mu\text{L}$  de muestra en un baño termostático a la temperatura de 40°C durante 45 minutos, tiempo en el que la fibra con un recubrimiento polimérico de PDMS 100  $\mu\text{m}$  queda expuesta en el espacio de cabeza hasta alcanzar el equilibrio, según lo expresado por Steffen y Pawliszyn en 1996. Tras extraer la fibra del vial, esta es insertada en la puerta de inyección de un cromatógrafo de gases. De forma paralela se realiza este análisis a temperatura ambiente (22 °C).

#### III.4.1.2.- *Aumento de la fuerza iónica.*

El coeficiente de reparto de los analitos entre el espacio de cabeza y la disolución acuosa puede modificarse con un aumento de la fuerza iónica de esta última. Esto se consigue añadiendo a la muestra una disolución saturada de ClNa, de esta forma queda favorecida la difusión de los componentes más polares hacia el espacio de cabeza, afectando en menor medida a aquellos de menor polaridad.

En la muestra se añade una disolución saturada de ClNa en una proporción del 36% en volumen con relación a la muestra analizada, según lo estipulado por Steffen y Pawliszyn en 1996. De esta forma los

500 $\mu$ L quedan repartidos entre 320  $\mu$ L de muestra y 180  $\mu$ L de disolución saturada de ClNa.

De forma paralela se efectúa el análisis de la muestra sin adición de ClNa.

#### III.4.1.3.- *Agitación de la muestra.*

La técnica en espacio de cabeza se mejora con el empleo de la agitación continuada de la muestra como consecuencia de una uniformidad en la concentración de volátiles en la matriz y la constante disponibilidad de los mismos en la superficie en contacto con el espacio de cabeza.

En el ensayo la muestra se somete a agitación mediante ultrasonidos (Ultrasonic Cleaner JkM. CE) durante 45 minutos.

#### III.4.2.- **Determinación de los tiempos de equilibrio**

De igual forma que en el apartado anterior catorce componentes puros presentes en el zumo de naranja procedentes de la casa comercial Acros Organics U.S.A., han sido escogidos por sus características de polaridad y volatilidad como representantes del comportamiento del resto de componentes en el cálculo del tiempo de equilibrio.

Se parte de una disolución acuosa con una concentración de 1 ppm de todos los componentes a analizar. 320 $\mu$ L de esta disolución se introducen junto con 180 $\mu$ L de una disolución de ClNa saturada en un vial de 2mL de capacidad (HP 32mm x 11mm) provisto de septum de teflón.

La cantidad de muestra a analizar se determina en función de la capacidad del vial utilizado, para obtener una adecuada relación de volúmenes entre la muestra y el espacio de cabeza.

La aguja es introducida a través del septum del vial, seguidamente se presiona el émbolo hasta conseguir que la fibra quede en contacto con el espacio de cabeza, manteniendo la misma durante intervalos de tiempo que oscilan entre 15 y 75 minutos. Una vez transcurrido este tiempo la fibra se retira del vial y es introducida en la puerta de inyección del cromatógrafo de gases.

La representación gráfica de las áreas obtenidas para cada componente frente al tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza define una curva que nos permite determinar el tiempo requerido hasta alcanzar el equilibrio químico entre las tres fases que conforman el sistema. Este tiempo es identificado como el punto en el cual se alcanza una meseta en la absorción.

#### **III.4.3.- Preparación de la muestra**

Una vez optimizado el método y conocido el tiempo adecuado de exposición de los componentes volátiles en cada tipo de fibra, pasamos a analizar la fracción aromática en el espacio de cabeza del zumo de naranja. Para ello partimos de 320 $\mu$ L de zumo de naranja y 180 $\mu$ L de una disolución saturada de CINA introducidos en un vial de 2mL de características idénticas a las descritas anteriormente.

Dada la afinidad de los terpenos hacia la fase de PDMS, en muestras de elevado contenido en los mismos, caso del zumo refinado y la pulpa fina, y como consecuencia de una inadecuada resolución cromatográfica,

resulta necesario la dilución de estas muestras. Por este motivo estas muestras se diluyen en una proporción de 1/20 con relación al resto de las analizadas.

Todos los análisis se han realizado a temperatura ambiente, próxima a los 22 °C, y sin agitación de la muestra mediante ultrasonidos.

### **III.5.- CROMATOGRAFÍA GASEOSA. ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

#### **III.5.1.- Análisis cualitativo y cuantitativo de componentes volátiles. SDE**

Una vez extraídos los componentes volátiles, estos son identificados y valorados cuantitativamente mediante cromatografía de gases, empleando para ello un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 Serie II plus, equipado con un detector de ionización de llama (FID).

La separación se lleva a cabo en una columna capilar HP5 (5% Fenil Metil Siloxano entrecruzado) de 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de fase estacionaria.

Las temperaturas de inyección y detección utilizadas han sido 250 °C respectivamente. El gas portador empleado es Helio, siendo el flujo en columna de 1mL/minuto. En la inyección se emplea una relación de división de flujo de 100:1.

El programa de temperatura del horno aplicado ha sido:

Temperatura inicial	60° C
Tiempo inicial	4 minutos
Programa	1 °C/min, hasta 64 °C
Programa	2,5 °C/min
Temperatura Final	155 °C

#### III.5.1.1.- *Identificación de componentes*

La identificación de componentes se realiza mediante inyección de las muestras en un cromatógrafo de gases de características idénticas al anteriormente descrito y acoplado a un espectrómetro de masas HP 5972 como detector.

La temperatura programada para el inyector es de 250 °C y para el detector de 280°C. El gas portador de igual forma es el Helio con un flujo en columna de 1,3 mL/min y una relación de división de 16:1.

El programa de temperatura aplicado del horno ha sido:

Temperatura inicial	50° C
Tiempo inicial	2 minutos
Programa	1,5 °C/min, hasta 85 °C
Programa	2,5°C/min
Temperatura Final	160 °C

La identificación se realiza por comparación de los espectros de masas y los tiempos de retención de los componentes a identificar con los de los componentes puros empleados como patrones de referencia.

### III.5.1.2.- *Valoración cuantitativa de volátiles. SDE*

La cuantificación para los componentes volátiles totales se lleva a cabo mediante calibración con estándar interno, empleando como tal la ciclohexanona. De esta forma consideramos los factores de respuesta y las áreas relativas de cada componente con relación al estándar interno.

Para ello se determina la recta de calibrado de cada componente añadiendo a cada una de las disoluciones realizadas una cantidad exacta de ciclohexanona. De esta forma consideramos a su vez la cantidad de ciclohexanona añadida y el área correspondiente a la misma, consiguiendo determinar el factor de respuesta relativo al estándar interno de cada componente. Estos resultados quedan reflejados en la Tabla.III.5.-1., de factores de respuesta para la técnica de extracción destilación simultánea.

En el cálculo de la concentración se recurre al área del componente a determinar, el factor de respuesta relativo de ese componente y la relación existente entre la cantidad de ciclohexanona añadida y el área obtenida en cada uno de los cromatogramas, tal como se describe en la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración}_{\text{analito}} = \text{Area}_{\text{analito}} \times \text{F.R.} \times (\text{Area}_{\text{E.interno}} / \text{Concentración}_{\text{E.Interno}})$$

De esta forma consideramos la linealidad del detector para cada componente y las posibles variaciones que puedan ocurrir durante el procesado de la técnica analítica.

#### *III.5.1.3.- Recuperación de componentes volátiles en SDE.*

Se han evaluado las recuperaciones de los distintos constituyentes volátiles a lo largo de todo el proceso de preparación de la muestra y posterior análisis cromatográfico.

Para ello se parte de una cantidad determinada de cada uno de los componentes identificados anteriormente. A continuación se transfieren al matraz de destilación seguido de la adición de agua hasta alcanzar un volumen final de 1 L. De igual forma que a las muestra, también se le adiciona ciclohexanona como estándar interno y se somete la muestra al mismo tratamiento.

Los cálculos de la recuperación relativa se realizan considerando las concentraciones de cada estándar puro adicionado y las extraídas relativas al estándar interno, calculadas de igual forma que en las muestras problema. Siendo esto referido al 100%, obtenemos la recuperación de cada componente durante todo el proceso de extracción y determinación analítica.

En el cálculo de la recuperación absoluta, sin tener en cuenta el estándar interno, se considera el área del patrón extraído y su factor de respuesta lineal.

La comparación de las concentraciones adicionadas con las extraídas y referidas al 100% nos informa a cerca de la recuperación absoluta de cada componente en SDE.



Tabla III.5.-.1. CALIBRACIÓN Y FACTORES DE RESPUESTA RELATIVOS AL ESTÁNDAR INTERNO

COMPONENTES	TIEMPO RETENCIÓN	FACTOR RESP. RELATIVO	COEF. REGRE. (R <sup>2</sup> )	FACTOR RESP. ABSOLUTO	COEF. REGRE. (R <sup>2</sup> )
ETANOL	3.58	2.038	0.992	14.47	0.989
ACETONA	3.68	1.322	0.988	9.36	0.990
METIL-VINIL-CETONA	4,13	1,125	0.985	7.64	0.995
ACETATO DE ETILO	4.30	1.656	0.992	11.78	0.999
1-BUTANOL	4.77	0.991	0.993	7.31	0.997
1-PENTEN-3-OL	5.02	0.914	0.995	6.38	0.996
ETIL-VINIL-CETONA	5.09	1.079	0.992	7.64	0.995
VALERALDEHIDO	5.24	1.067	0.999	7.26	0.996
2-PENTANOL	5,26	0.921	0.995	6.52	0.996
BUTIRATO DE METILO	5.67	1.167	0.993	8.24	0.993
3-METIL-1-BUTANOL	5.88	0.882	0.993	6.27	0.996
ACETALDEHIDO	7,14	1,184	0.993	7.25	0.993
HEXANAL	7.62	0.965	0.991	6.84	0.993
BUTIRATO DE ETILO	7.61	1.072	0.998	7.30	0.996
FURFURAL	8.85	1.451	0.991	10.35	0.995
TRANS-2-HEXENAL	9.64	0.973	0.991	6.91	0.994
TRANS-2-HEXEN-1-OL	10.16	0.857	0.995	6.07	0.996
CICLOHEXANONA	11.53	0,958	0.992	7.02	0.994
HEPTANAL	11.80	0.975	0.993	6.90	0.996
α-PINENO	13.52	0.626	0.994	4.44	0.995
1-HEPTANOL	15.31	0.808	0.995	5.74	0.997
SABINENO	15.60	0.653	0.994	4.63	0.996
β-PINENO	15.79	0.624	0.993	4.42	0.995
β-MIRCENO	16.48	0.640	0.983	4.42	0.998
OCTANAL	17.12	0.879	0.994	5.97	0.987
α-FELANDRENO	17.26	0.629	0.993	4.31	0.999
Δ <sub>3</sub> -CARENO	17.59	0.600	0.996	4.65	0.998
α-TERPINENO	17.94	0.732	0.994	5.02	0.999
LIMONENO	18.74	0.715	0.989	5.42	0.953

<b>γ-TERPINENO</b>	20.27	0.668	0.995	4.57	0.999
<b>OCTANOL</b>	20.86	0.795	0.995	5.43	0.998
<b>LINALOL</b>	22.50	0.978	0.995	5.93	0.998
<b>NONANAL</b>	22.74	0.887	0.997	6.06	0.997
<b>CITRONELAL</b>	25.42	0.858	0.997	5.85	0.997
<b>TERPINEN-4-OL</b>	26.78	0.771	0.978	5.36	0.998
<b>α-TERPINEOL</b>	27.49	0.853	0.995	5.83	0.998
<b>DECANAL</b>	28.20	0.833	0.996	5.69	0.999
<b>ACETATO DE OCTILO</b>	28.51	0.898	0.997	6.13	0.998
<b>NEROL</b>	29.42	0.827	0.996	5.67	0.997
<b>CITRONELOL</b>	29.36	0.724	0.998	5.26	0.973
<b>CARVEOL</b>	29.54	1.343	0.995	9.83	0.979
<b>NERAL</b>	30.07	0.670	0.999	4.84	0.973
<b>CARVONA</b>	30.25	0.642	0.998	4.73	0.971
<b>GERANIOL</b>	30.73	0.721	0.998	5.23	0.972
<b>ACETATO DE LINALILO</b>	30.82	0.899	0.997	6.13	0.997
<b>GERANIAL</b>	31.58	0.671	0.999	4.85	0.973
<b>PERIALDEIDO</b>	31.82	0.756	0.998	5.50	0.976
<b>UNDECANAL</b>	33.39	1.012	0.987	6.91	0.985
<b>TERPENIL ACETATO</b>	35.56	0.956	0.985	6.52	0.983
<b>ACETATO DE CITRONELILO</b>	35.65	0.756	0.999	5.17	0.998
<b>ACETATO DE NERILO</b>	36.21	0.958	0.971	7.05	0.991
<b>ACETATO DE GERANILO</b>	37.13	0.780	0.998	5.33	0.998
<b>DODECANAL</b>	38.33	0.815	0.987	7.75	0.971
<b>ANTRANILATO DE ETILO</b>	38.67	1.250	0.991	12.64	0.982
<b>CARIOFILENO</b>	39.01	0.572	0.999	3.92	0.998
<b>α-HUMULENO</b>	40.59	0.561	0.999	3.84	0.999
<b>DODECANOL</b>	41.33	0.714	0.999	4.89	0.999
<b>VALENCENO</b>	42.39	0.820	0.995	6.03	0.980

### **III.5.2.- Análisis cualitativo y cuantitativo de componentes volátiles en espacio de cabeza. SPME.**

Estos análisis se realizan partiendo de 320  $\mu\text{L}$  de una disolución estándar de todos los componentes a determinar junto con 180  $\mu\text{L}$  de una disolución saturada de  $\text{CINa}$ . La mezcla es introducida en un vial de 2 mL provisto de cierre con septum y la fibra se mantiene en el espacio de cabeza de la muestra durante el tiempo estimado de equilibrio para cada recubrimiento polimérico.

Una vez adsorbidos los componentes volátiles en la fibra al alcanzar estos el equilibrio químico entre las tres fases que conforman el sistema, son identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases.

La fibra se retira del vial y es introducida en la puerta de inyección del cromatógrafo de gases donde ocurre la desorción de volátiles por efecto de la temperatura del inyector. Se emplea para ello un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 Serie II plus, equipado con un detector de ionización de llama (FID).

Las condiciones de inyección en cuanto al SPME se refiere son:

Profundidad de inmersión de la aguja: 2,5 cm.

Diámetro de la cámara de vaporización: 0,75 mm.

Tiempo de desorción en el interior del inyector: 5 minutos.

Las condiciones de inyección en el cromatógrafo son las mismas que las definidas anteriormente para el análisis de volátiles totales. Únicamente introducimos una variación, la aplicación de splitless durante

los primeros 0,6 minutos de la inyección para mejorar la retención de los componentes de mayor volatilidad.

#### *III.5.2.1.- Identificación de componentes*

La valoración cualitativa se realiza de igual forma que en el caso de volátiles totales. La fibra del sistema SPME es introducida en la puerta de inyección del cromatógrafo de gases acoplado al sistema de detección de espectrometría de masas, definido anteriormente. Los tiempos de desorción y la profundidad de inyección en el liner coinciden con las descritas para la cromatografía empleadas en la cuantificación.

#### *III.5.2.2.- Valoración cuantitativa*

En la cuantificación de volátiles en el espacio de cabeza se realiza la calibración de los componentes analizados empleando un estándar externo de referencia.

De igual forma que en el caso de los componentes volátiles totales se determinan las rectas de calibrado de cada uno de los componentes haciendo para ello diluciones de una disolución concentrada. Los valores determinados quedan reflejados en la Tabla III.5.-2.

Para el cálculo de las concentraciones en el equilibrio, en este caso únicamente consideramos el área del componente identificado y su factor de respuesta correspondiente.

Tabla III.5.-2.- CALIBRACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES  
MEDIANTE SPME

COMPONENTES	PDMS.	COEF. REGRESIÓN (R <sup>2</sup> )	PA..	COEF. REGRESIÓN (R <sup>2</sup> )
ACETALDEHIDO	14,618	0,994	22,334	0,993
ETANOL	30,625	0,973	133,390	0,985
ACETONA	113,790	0,988	42,365	0,961
METIL-VINIL-CETONA	30,337	0,904	15,016	0,893
ACETATO DE ETILO	6,166	0,987	7,255	0,963
1-BUTANOL	---	---	11,044	0,996
1-PENTEN-3-OL	26,212	0,945	5,950	0,976
ETIL-VINIL-CETONA	29,321	0,952	3,414	0,997
VALERALDEHIDO	1,638	0,986	2,094	0,996
2-PENTANOL	0,819	0,985	4,117	0,997
BUTIRATO DE METILO	1,232	0,989	3,236	0,995
3-METIL-1-BUTANOL	12,314	0,996	2,851	0,997
HEXANAL	0,526	0,995	0,758	0,997
BUTIRATO DE ETILO	0,454	0,984	0,862	0,992
FURFURAL	42,181	0,999	8,789	0,994
TRANS-2-HEXENAL	1,184	0,998	1,231	0,997
TRANS-2-HEXEN-1-OL	5,011	0,983	1,283	0,997
HEPTANAL	0,226	0,995	0,329	0,993
$\alpha$ -PINENO	0,129	0,946	0,202	0,992
1-HEPTANOL	0,402	0,999	0,254	0,999
SABINENO	0,133	0,951	0,212	0,957
$\beta$ -PINENO	0,105	0,901	0,207	0,937
$\beta$ -MIRCENO	0,054	0,995	0,085	0,990
OCTANAL	0,080	0,977	0,059	0,926
$\alpha$ -FELANDRENO	0,077	0,921	0,221	0,923
$\Delta_3$ -CARENO	0,065	0,996	0,110	0,991
$\alpha$ -TERPINENO	0,081	0,992	0,100	0,991
LIMONENO	0,064	0,981	0,087	0,998

<b>γ-TERPINENO</b>	0,073	0,996	0,076	0,990
<b>OCTANOL</b>	0,192	0,992	0,137	0,998
<b>LINALOL</b>	0,276	0,886	0,068	0,892
<b>NONANAL</b>	0,079	0,966	0,164	0,943
<b>CITRONELAL</b>	0,120	0,932	0,091	0,959
<b>TERPINEN-4-OL</b>	0,374	0,989	0,207	0,962
<b>α-TERPINEOL</b>	0,8824	0,982	0,290	0,969
<b>DECANAL</b>	0,056	0,993	0,123	0,949
<b>ACETATO DE OCTILO</b>	0,056	0,993	0,132	0,952
<b>NEROL</b>	0,455	0,988	0,183	0,966
<b>CITRONELOL</b>	0,165	0,976	0,173	0,986
<b>CARVEOL</b>	2,077	0,861	3,157	0,950
<b>NERAL</b>	0,159	0,998	0,127	0,961
<b>CARVONA</b>	0,268	0,971	0,286	0,976
<b>GERANIOL</b>	0,559	0,998	0,401	0,990
<b>ACETATO DE LINALILO</b>	0,163	0,952	0,101	0,941
<b>GERANIAL</b>	0,160	0,998	0,136	0,963
<b>PERIALDEIDO</b>	0,216	0,983	0,232	0,964
<b>UNDECANAL</b>	0,089	0,997	0,159	0,956
<b>ACETATO DE TERPENILO</b>	0,147	0,985	0,093	0,940
<b>ACETATO DE CITRONELILO</b>	0,074	0,997	0,090	0,978
<b>ACETATO DE NERILO</b>	0,120	0,993	0,114	0,976
<b>ACETATO DE GERANILO</b>	0,110	0,992	0,108	0,976
<b>DODECANAL</b>	0,124	0,969	0,152	0,925
<b>ANTRANILATO DE ETILO</b>	1,367	0,988	1,047	0,929
<b>CARIOFILENO</b>	0,058	0,945	0,080	0,964
<b>α-HUMULENO</b>	0,072	0,938	0,093	0,983
<b>DODECANOL</b>	0,154	0,953	0,124	0,875
<b>VALENCENO</b>	0,085	0,947	0,105	0,965

## **IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





#### **IV.1.- RECUPERACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES MEDIANTE DESTILACIÓN-EXTRACCIÓN SIMULTÁNEA.**

En el estudio de los aromas de los alimentos resulta necesario conocer la relación existente entre la concentración detectada tras la extracción e identificación de los componentes volátiles y la concentración existente en la matriz original (Green y Payne, 1989). Por este motivo, en este apartado estudiamos la recuperación del sistema utilizado en el estudio de los componentes volátiles totales, teniendo en cuenta factores como el efecto de la matriz, la solubilidad de los componentes analizados en agua o disolventes orgánicos, y el punto de ebullición de los mismos en función de la presión a la que se trabaja durante la extracción y posterior concentración, que es 40 y 400 mm de Hg respectivamente (Tabla IV.1.-1.).

Tabla IV.1.-1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES

COMPONENTES	p.eb. (°C)			Solubilidad	
	760 mm Hg	400 mm Hg	40 mm Hg	Agua	Hexano
Hexano	<b>68,7</b>	<b>49,6</b>	<b>-2,3</b>	-	+
Acetaldehido	20,8	---	---	+	-
Etanol	78,5	63,5	19	+	-
Acetona	56,2	39,5	-9,4	+	-
Metil-vinil-cetona	81,4	---	---	+	-
Acetato de etilo	77,1	59,3	9	+	-
1-Butanol	117,2	101	53,4	+	-
1-Penten-3-ol	114	---	---	≈	-
Valeraldehido	103	---	---	≈	-
2-Pentanol	118,9	102,3	54	+	-
Butirato de metilo	102	83,1	29,6		
3-metil-1-butanol	130,6	113,7	63,4	+	≈
Hexanal	128,3	---	---	-	≈
Butirato de etilo	121	100	41,5		
Furfural	161,7	141,8	82,1	-	≈
Trans-2-Hexenal	146,7	---	---	-	≈
Trans-2-Hexen-1ol	156,8	---	---	-	
Ciclohexanona	<b>155,6</b>	<b>132</b>	<b>67,8</b>	-	≈
Heptanal	152,8	125,5	66,3	-	≈
α-Pineno	156,2	132,3	66,8	-	≈
1-Heptanol	176	155,6	99,8	-	≈
Sabineno	163	---	---	-	≈
β-Pineno	164,6	136,1	71,5	-	≈
β-Mirceno	171,5	148,3	82,6	-	≈
Octanal	171,7	156,5	120	-	≈
α-Felandreno	175	152	87,8	-	-

<b><math>\Delta_3</math>-Careno</b>	167	---	---	-	+
<b><math>\alpha</math>-Terpineno</b>	177,2	---	---	-	$\approx$
<b>Limoneno</b>	178	151,4	84,3	-	+
<b><math>\gamma</math>-Terpineno</b>	183	---	---	-	$\approx$
<b>Octanol</b>	194	173,8	115,2	-	$\approx$
<b>Linalol</b>	198	175,6	109,9	-	$\approx$
<b>Nonanal</b>	190	---	---	-	+
<b>Citronelal</b>	207,8	183,8	116,1	-	$\approx$
<b><math>\alpha</math>-Terpineol</b>	220,8	194,3	126	$\approx$	$\approx$
<b>Decanal</b>	208	186,3	122	-	$\approx$
<b>Acetato de octilo</b>	199	---	---	-	-
<b>Nerol</b>	224	203,5	136,1	-	$\approx$
<b>Citronelol</b>	244,4	201	137,2	-	+
<b>Carveol</b>	225	---	---	-	+
<b>Neral</b>	120	---	---	-	$\approx$
<b>Carvona</b>	231	203	133	-	$\approx$
<b>Geraniol</b>	230	207,8	141,8	-	$\approx$
<b>Acetato de linalilo</b>	220	196,2	127,7	-	$\approx$
<b>Geranial</b>	229	205	135	-	$\approx$
<b>Undecanal</b>	---	---	---	-	+
<b>Acetato de citronelilo</b>	217	197,8	140,5	-	$\approx$
<b>Acetato de nerilo</b>	236	---	---	-	
<b>Acetato de geranilo</b>	243,3	219,8	150	-	$\approx$
<b>Dodecanal</b>	257	231,8	157,8	-	$\approx$
<b><math>\alpha</math>-Humuleno</b>	268	---	---	-	
<b>Dodecanol</b>	259	235,7	167,2	-	$\approx$

p.eb. =punto de ebullición, + = soluble; - = insoluble,  $\approx$  = Parcialmente soluble.  
Handbook of Chemistry and Physics. David R. Lide Editor in Chief. 72<sup>ND</sup> Edition.

Para ello se preparan disoluciones acuosas estándar mezcla de los compuestos aromáticos que se van a analizar en el zumo de naranja. La concentración resultante de los patrones de referencia se encuentra en un rango comprendido entre 11 y 35 ppm; esta variación está asociada con la diferente densidad y volatilidad de cada uno de ellos en las condiciones ambientales en que son manipulados.

Tras efectuar las sucesivas destilaciones, concentraciones y análisis cromatográficos de tres disoluciones estándar, se realizan los cálculos de recuperación de los distintos componentes, teniendo en cuenta los factores de respuesta absolutos y los relativos al estándar interno (Tabla III.5.-1.), como porcentaje de componente analizado respecto al correspondiente contenido inicial pesado.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la siguiente Tabla IV.1.-2. Destaca, en primer lugar, que no se detectan diferencias importantes entre las recuperaciones relativas al estándar interno y las recuperaciones absolutas calculadas a partir del factor de respuesta, dado que la ciclohexanona, que se aplica como estándar interno, es prácticamente recuperada al 100%.

En relación a los componentes de mayor volatilidad, próxima a la del hexano, agrupados en el intervalo del acetaldehído hasta 1-butanol, se determina la pérdida total de los mismos como consecuencia de sus muy bajos puntos de ebullición a la presión de 40 mm de Hg, a la que se opera durante la destilación, junto con su práctica insolubilidad en hexano.

Aquellos componentes de volatilidad intermedia cuyo punto de ebullición varía entre 54 y 82°C, a pesar de ser superior a la temperatura de trabajo de 42-45 °C y tener una ligera solubilidad en hexano, presentan una muy escasa recuperación, comprendida entre un 2 y un 14%. Para estos las pérdidas están asociadas al proceso final de concentración en el que la disolución de hexano reduce su volumen veinticinco veces aproximadamente, descartando un destilado rico en componentes de elevada volatilidad.

Componentes de media y baja volatilidad, entre los que se incluyen aldehídos y monoterpenos, presentan recuperaciones comprendidas entre un 60 y un 80%; estos componentes se caracterizan por tener una ligera o escasa solubilidad en hexano, por lo que los valores de recuperación se asocian más a efectos de solubilidad que a las pérdidas acaecidas durante la etapa de concentración.

Por último, se encuentra un amplio grupo de compuestos, cuya recuperación oscila entre 90 y 100%, y que engloba los componentes de naturaleza sesquiterpénica junto con aldehídos, alcoholes y ésteres de elevado peso molecular. Estos compuestos son poco volátiles y poseen elevada afinidad por el hexano, lo que se traduce en una mayor solubilidad y porcentaje de recuperación, tanto durante la destilación-extracción como en la etapa final de concentración.

Como resultado global podríamos deducir que este sistema de recuperación de volátiles, diseñado por Lickens y Nickerson, únicamente es favorable en la recuperación de componentes de menor volatilidad que el disolvente orgánico utilizado y de mayor afinidad hacia el agente extractante. En el caso del zumo de naranja que nos ocupa, su aplicación a nivel de análisis cuantitativo es aconsejable en el estudio de la composición del mismo en hidrocarburos terpénicos así como en aldehídos, alcoholes y ésteres de elevado peso molecular. En la determinación cualitativa puede ser ampliada su utilización para un gran número de los compuestos volátiles presentes en los zumos, pero no es adecuada para componentes cuya volatilidad resulte similar a la del disolvente orgánico utilizado en la extracción, cuya recuperación es nula.

Tabla IV.1.-2.- **RECUPERACIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES MEDIANTE SDE.**

Componentes	Muestra	Análisis		% Recuperación	
	Inicial	Relativo	Absoluto	Relativa	Absoluta
Acetaldehido	28,65 ± 0,49	4,99 ± 0,08	4,91 ± 0,19	17,40	17,14
Etanol	23,20 ± 0,98	0	0	0	0
Acetona	22,10 ± 1,13	0	0	0	0
Metil-vinil-cetona	27,40 ± 1,27	0	0	0	0
Acetato de etilo	27,35 ± 0,92	0	0	0	0
1-Butanol	24,30 ± 0,14	0	0	0	0
1-Penten-3-ol	26,70 ± 0,99	0,51 ± 0,72	0,51 ± 0,72	1,87	1,87
Etil-vinil-cetona	26,90 ± 0,42	0,60 ± 0,85	0,62 ± 0,88	2,22	2,36
Valeraldehido	24,35 ± 1,76	2,23 ± 0,04	2,19 ± 0,001	9,30	9,03
2-Pentanol	22,65 ± 0,35	1,71 ± 0,03	1,75 ± 0,00	7,54	7,73
Butirato de metilo	27,95 ± 0,21	3,46 ± 0,20	3,54 ± 0,29	12,39	12,67
3-metil-1-butanol	24,15 ± 0,92	3,45 ± 0,18	3,54 ± 0,11	14,00	14,7
Hexanal	26,00 ± 0,56	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,29	0,31
Butirato de etilo	30,30 ± 0,70	0,13 ± 0,06	0,100 ± 0,00	0,44	0,33
Furfural	35,25 ± 1,34	3,39 ± 0,44	3,51 ± 0,41	9,68	9,96
Trans-2-Hexenal	25,15 ± 0,63	14,69 ± 1,46	15,09 ± 1,82	58,51	60
Trans-2-Hexen 1-ol	25,55 ± 0,07	13,09 ± 0,31	13,09 ± 0,31	50	51
Ciclohexanona	13,80 ± 0,05	---	13,24 ± 0,25	---	96
Heptanal	25,40 ± 0,42	17,18 ± 2,98	17,64 ± 3,39	67,5	69,5
α-Pineno	27,30 ± 1,41	18,80 ± 3,66	19,33 ± 4,17	69	71
1-Heptanol	26,05 ± 2,75	24,35 ± 4,82	25,06 ± 5,48	93	96
Sabineno	24,60 ± 1,69	18,45 ± 3,41	18,96 ± 3,90	75	77
β-Pineno	26,95 ± 1,20	20,13 ± 2,47	20,65 ± 2,98	75	77
β-Mirceno	25,30 ± 0,99	19,94 ± 3,50	19,97 ± 3,92	78	79
Octanal	24,70 ± 0,14	22,95 ± 3,80	22,60 ± 4,22	93	92
α-Felandreno	26,30 ± 1,27	20,43 ± 3,62	20,31 ± 4,03	77	77
Δ <sub>3</sub> -Careno	27,15 ± 0,07	18,20 ± 2,32	20,44 ± 3,05	67	79
α-Terpineno	25,75 ± 2,05	20,86 ± 1,52	20,70 ± 1,95	82	93

<b>Limoneno</b>	24,95 ± 0,07	24,40 ± 3,02	26,78 ± 3,90	98	107
<b>γ-Terpineno</b>	26,00 ± 0,56	23,88 ± 4,20	23,68 ± 4,67	92	90
<b>Octanol</b>	25,60 ± 1,27	25,98 ± 4,20	25,72 ± 4,92	101	100
<b>Linalol</b>	24,35 ± 0,77	29,75 ± 3,78	23,74 ± 3,53	122	98
<b>Nonanal</b>	24,85 ± 2,61	22,60 ± 5,45	22,37 ± 5,85	90	89
<b>Citronelal</b>	25,25 ± 0,35	22,27 ± 3,40	21,98 ± 3,82	88	87
<b>Terpinen-4-ol</b>	26,40 ± 0,28	21,62 ± 3,51	21,76 ± 3,99	82	82
<b>α-Terpineol</b>	26,25 ± 1,34	21,82 ± 2,70	21,57 ± 3,08	83	82
<b>Decanal</b>	25,45 ± 1,20	22,16 ± 3,38	21,93 ± 3,81	87,50	96
<b>Acetato de octilo</b>	25,20 ± 0,84	25,83 ± 4,98	25,54 ± 5,46	102	101
<b>Carveol</b>	24,75 ± 3,74	10,30 ± 3,17	10,93 ± 3,59	41	43,5
<b>Neral</b>	10,97 ± 0,31	8,86 ± 1,19	9,26 ± 1,45	81	85
<b>Carvona</b>	28,20 ± 0,28	22,08 ± 4,24	23,58 ± 5,02	78	84
<b>Geraniol</b>	25,60 ± 1,83	18,72 ± 3,73	19,67 ± 4,34	73	76
<b>Acetato de linalilo</b>	26,15 ± 0,49	25,27 ± 5,04	24,99 ± 5,51	97	96
<b>Geranial</b>	16,35 ± 0,63	13,02 ± 1,90	13,63 ± 2,28	80	84
<b>Perialdehido</b>	28,85 ± 0,14	24,03 ± 5,12	25,31 ± 5,92	83	88
<b>Undecanal</b>	24,85 ± 0,56	21,41 ± 4,75	21,20 ± 5,15	86	85
<b>Acetato de terpenilo</b>	28,90 ± 0,56	26,50 ± 5,08	26,19 ± 5,58	92	91
<b>Acetato de citronelilo</b>	25,80 ± 0,56	24,28 ± 3,11	23,07 ± 4,97	90	89
<b>Acetato de nerilo</b>	26,20 ± 0,42	28,17 ± 6,46	30,06 ± 7,53	107	114
<b>Acetato de geranilo</b>	26,20 ± 0,77	21,89 ± 3,81	21,67 ± 4,22	84	83
<b>Dodecanal</b>	23,30 ± 0,70	15,79 ± 4,58	21,78 ± 6,76	68	94
<b>Antranilato de etilo</b>	33,35 ± 0,70	8,62 ± 5,35	12,68 ± 8,09	26	38
<b>Cariofileno</b>	26,90 ± 0,70	23,17 ± 4,93	23,00 ± 5,38	90	85
<b>α-Humuleno</b>	24,30 ± 0,84	19,98 ± 4,73	19,84 ± 5,12	82	81
<b>Dodecanol</b>	23,75 ± 1,34	19,59 ± 6,35	19,46 ± 6,71	82	81
<b>Valenceno</b>	28,3 ± 0,28	23,34 ± 4,04	24,85 ± 4,83	83	88

#### **IV.2.- DETERMINACION DE COMPONENTES VOLATILES MEDIANTE HS-SPME. OPTIMIZACION Y TIEMPOS DE EQUILIBRIO**

La caracterización de volátiles en espacio de cabeza mediante la microextracción en fase sólida requiere, en primer lugar, la optimización de la sensibilidad del análisis, así como el conocimiento del tiempo óptimo que la fibra debe estar en contacto con el espacio de cabeza hasta alcanzar el equilibrio entre las tres fases existentes, dependiendo en gran medida de las características de polaridad y peso molecular de los componentes a determinar.

La microextracción en fase sólida en espacio de cabeza, como se ha definido anteriormente, es una técnica basada en el equilibrio de los analitos entre las tres fases que conforman el sistema. Estas tres fases incluyen el recubrimiento polimérico de la fibra (sólida), el espacio de cabeza (vapor) y la muestra acuosa (líquida).

El cálculo de la cantidad retenida de analitos en la fibra ha de realizarse una vez alcanzado el equilibrio entre las tres fases, pudiendo optimizar la técnica analítica mediante las modificaciones que se describen a continuación, que permiten aumentar principalmente la sensibilidad y, en parte, la reproducibilidad del método.

Catorce componentes volátiles representativos del aroma en el zumo de naranja han sido elegidos, por sus características de polaridad y volatilidad, para el estudio del efecto de los diferentes tratamientos sobre la adsorción de componentes volátiles en PDMS, manteniendo la fibra en el espacio de cabeza durante un tiempo de cuarenta y cinco minutos, según lo establecido por Steffen y Pawliszyn en 1996.



#### IV.2.1.- Efecto de la Temperatura

Un aumento de la temperatura de extracción enriquece la concentración de componentes volátiles en la fase vapor, sin embargo, también supone un cambio negativo en los coeficientes de reparto de los mismos entre las fases sólida y vapor. La elevación de la temperatura favorece, por tanto, el enriquecimiento de volátiles en el espacio de cabeza, pero en el caso de SPME un aumento de temperatura disminuye la capacidad de adsorción de la fibra para determinados componentes.

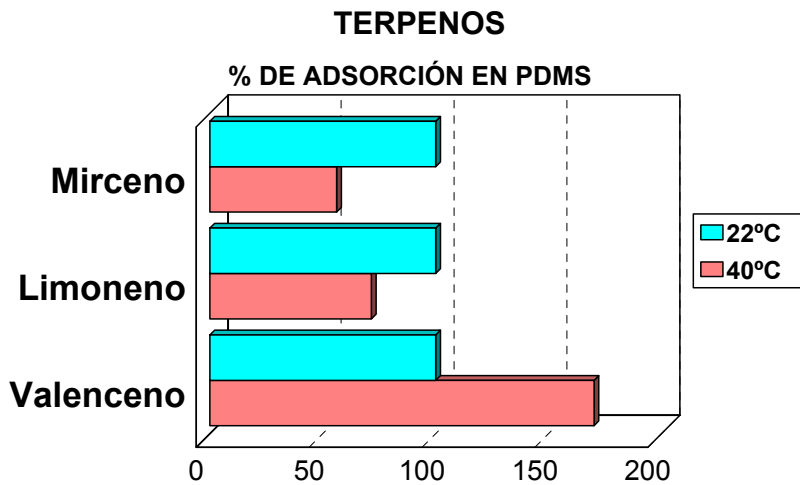
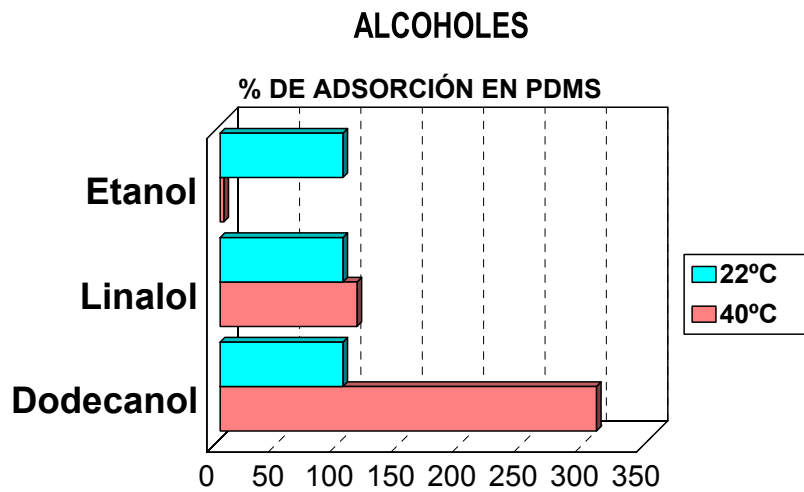
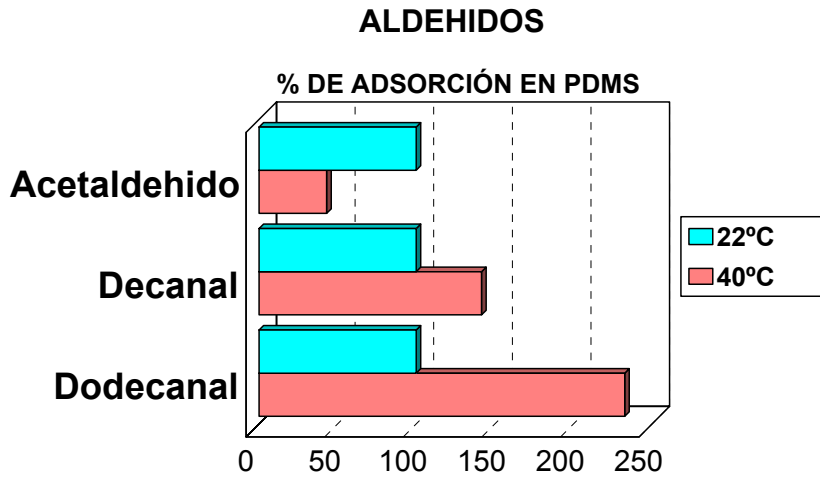
Este efecto queda reflejado en las gráficas que a continuación se exponen, en las que analizamos la retención de los 14 componentes considerados para la optimización del sistema, comparando la retención a temperatura ambiente 22°C y a 40°C (Figura IV.2.-1.).

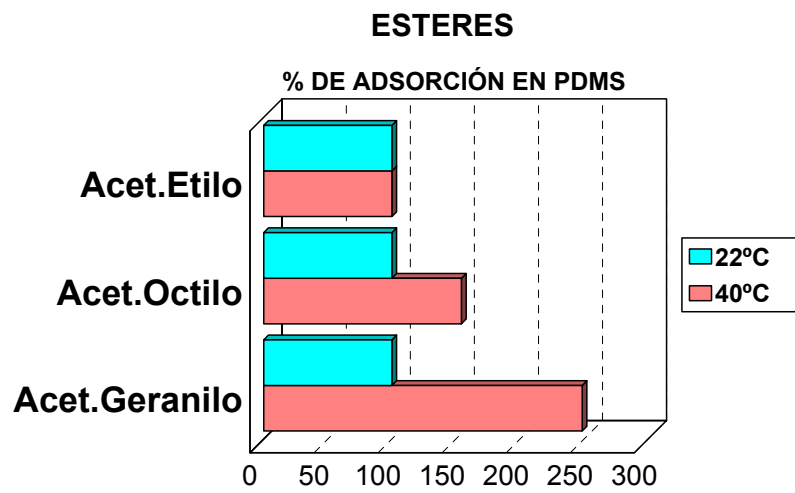
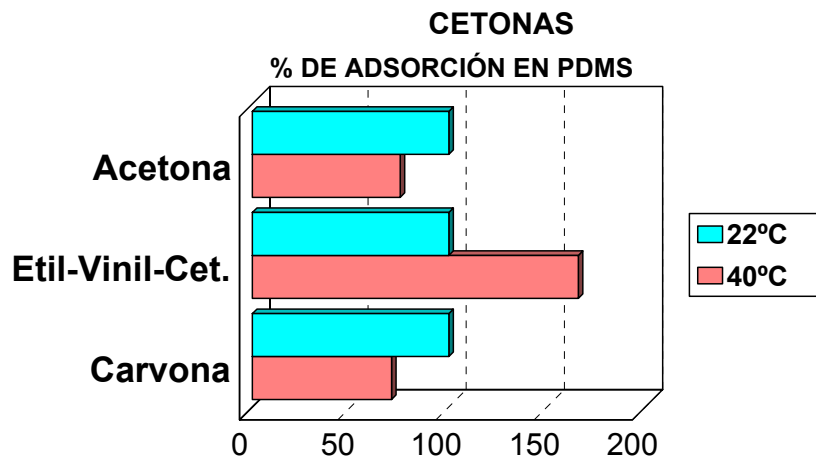
En general, se observa que un aumento de la temperatura favorece la adsorción de componentes de menor volatilidad, pero disminuye en gran medida la adsorción de los componentes con menor punto de ebullición, como es el caso de acetaldehído, acetona y etanol, componentes característicos del aroma en espacio de cabeza de la naranja.

En relación a los terpenos se observa que, con excepción del valenceno, un aumento de temperatura supone una menor adsorción de los mismos.

Por todo ello, se puede concluir que el aumento de la temperatura conlleva a un enriquecimiento en el espacio de cabeza de los componentes de menor volatilidad, aunque reduce la retención de los componentes más volátiles, que en condiciones ambientales de temperatura caracterizan el espacio de cabeza en el zumo de naranja.

Fig. IV.2.1.- EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ADSORCIÓN EN PDMS





Estos resultados coinciden con los publicados por Zhang y Pawliszyn en 1995, quienes afirman que un calentamiento de la muestra facilitaría el proceso de extracción mediante SPME, pero que a su vez supone una pérdida de capacidad de adsorción de los analitos por parte de la fibra. En este punto se ha de trabajar a una temperatura óptima para la fibra, en el entorno de los 20°C. Para ello, sugieren el paso de una corriente de CO<sub>2</sub> por la fibra, de tal forma que la muestra pueda ser calentada independientemente sin afectar en nada al comportamiento de la misma; este montaje hace la aplicación de la técnica más complicada dificultando su manejo.

A si mismo, Mingyu Jia *et al.* (1998), estudian el efecto de la temperatura sobre el tiempo de equilibrio y la capacidad de retención de PDMS. Encontrando una reducción en el tiempo de equilibrio, pero una disminución de la cantidad retenida. Estos autores explican este hecho, considerando la etapa de adsorción sobre PDMS como un proceso exotérmico. Un aumento de la temperatura aumenta la constante de reparto entre la muestra y el espacio de cabeza, pero a su vez disminuye la misma entre el gas y el recubrimiento, por lo que una menor cantidad será retenida.

#### **IV.2.2.- Efecto de la adición de ClNa**

La adición de cloruro sódico a la muestra conlleva el aumento de la fuerza iónica del medio acuoso y la disminución de la capacidad de solvatación del agua sobre los componentes volátiles presentes en la disolución acuosa. Esto favorece el enriquecimiento en componentes más volátiles en el espacio de cabeza, con la consecuente mejora del límite de detección del método. Este efecto, conocido con el nombre de “salting out” -traducido libremente como liberación por salificación-, fue

estudiado por Steffen y Pawliszyn en 1996, empleando PA como material polimérico de la fibra.

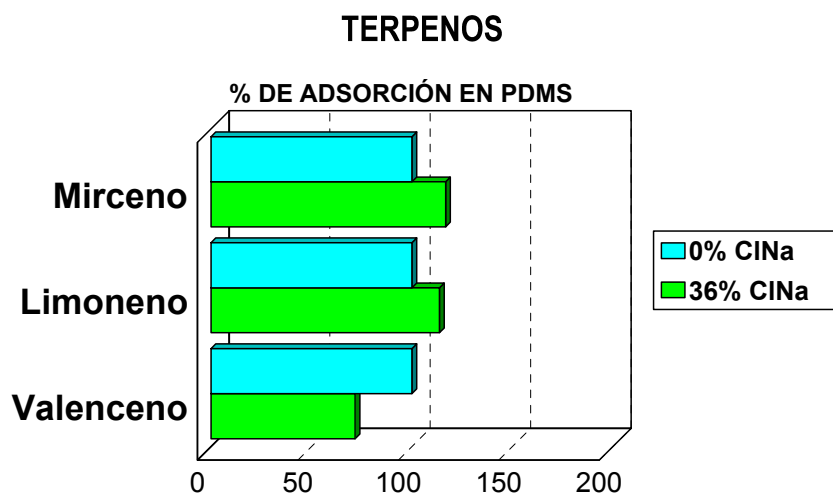
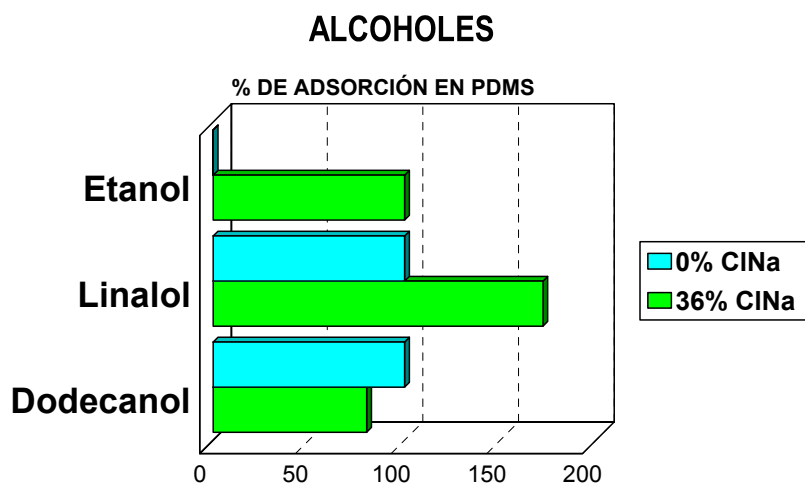
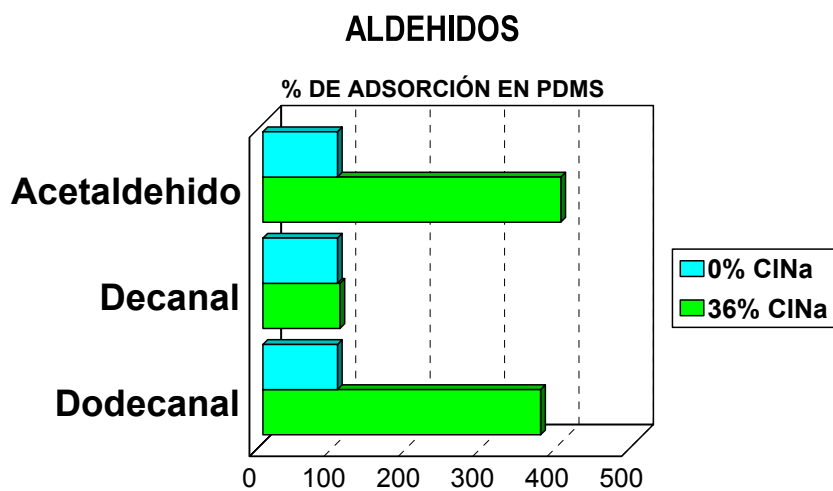
La variación de los coeficientes de partición de los componentes más polares entre la muestra acuosa y el espacio de cabeza por la adición de la sal, implica a su vez una modificación de los coeficientes de reparto en el segundo equilibrio establecido entre la fibra y el espacio de cabeza.

Estos resultados quedan reflejados en la Figura IV.2.-2. en la que se muestra la incidencia positiva de la adición de ClNa sobre los componentes de elevada polaridad. Así, se detecta un incremento importante de la adsorción de acetaldehído, etanol, linalol y dodecanal, mientras se mantiene constante la cantidad de decanal extraída. Asimismo destaca la no detección del etanol en ausencia de sal.

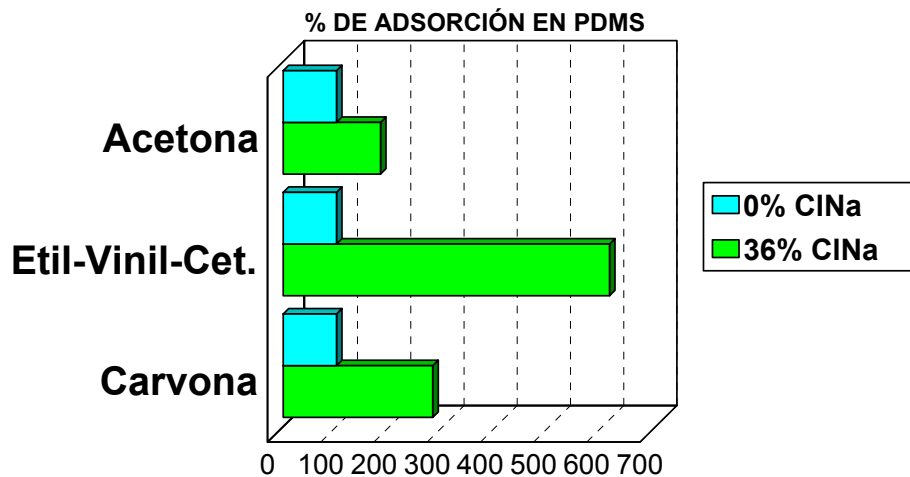
En el caso de los terpenos, componentes de baja volatilidad y prácticamente nula polaridad, el aumento de la fuerza iónica del medio no afecta en gran medida a su difusión en el espacio de cabeza, por lo que la variación de la adsorción es poco importante.

En el estudio del comportamiento de las cetonas, podemos observar que en el caso de acetona y etil-vinil-cetona, componentes de volatilidades próximas pero polaridades diferentes, destaca la mayor influencia de la adición de sal sobre el componente más polar, la segunda de ellas, como era de esperar.

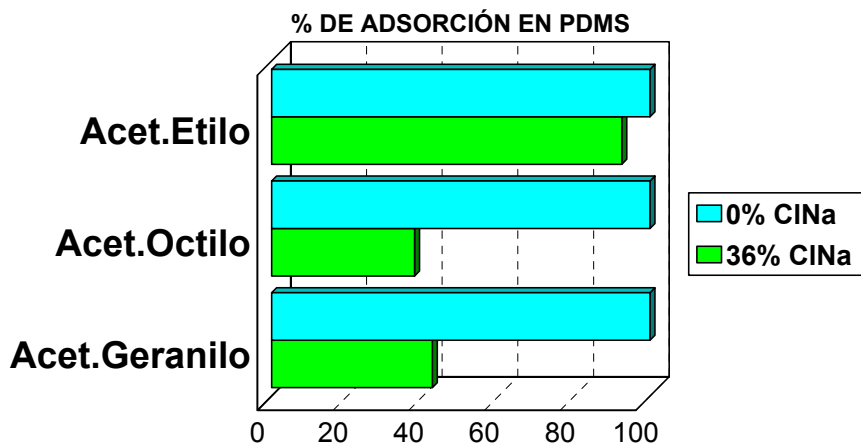
Fig.IV.2.-2.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE CINa EN LA ADSORCIÓN EN PDMS



### CETONAS



### ESTERES



Por el contrario, en el caso de los ésteres se determina la incidencia negativa del efecto “salting out” sobre los componentes de escasa polaridad, posiblemente debido al predominio de fenómenos de absorción en la propia sal de la disolución saturada.

Yang y Peppard en 1994 estudian el efecto de diferentes concentraciones de sal sobre la adsorción de determinados componentes volátiles en PDMS, encontrando que pueden apreciarse cuatro comportamientos distintos de los componentes.

Un primer grupo, en el que se incluye el linalol y la carvona, donde la adsorción aumenta proporcionalmente con la concentración de sal, dato coincidente con nuestros resultados.

Un segundo grupo, en el que la adsorción de componentes queda favorecida inicialmente por el incremento de la concentración salina, hasta alcanzar un valor máximo a partir del cual la cantidad de componente adsorbido por la fibra permanece constante. En este grupo incluyen a acetato de etilo y geranial. Sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos en esta experiencia, en la gráfica correspondiente a la adsorción de los ésteres puede observarse que en el caso del acetato de etilo su adsorción apenas si se modifica con la presencia de un 36% de concentración salina.

Un tercer grupo en el que se observa una disminución de la adsorción de componentes por parte de la fibra a partir de una adición de sal superior al 15%. En este grupo se incluyen hexanoato de etilo, ácido hexanóico y triacetín, componentes no estudiados en esta Memoria de Tesis.

Finalmente, el grupo cuarto en el que se observa una disminución de la adsorción con la presencia de la disolución salina; en este grupo estos autores incluyen el limoneno. Este dato no es coincidente con nuestros resultados, ya que en la determinación puede observarse la escasa incidencia de la concentración salina sobre la adsorción del limoneno y todos los terpenos estudiados, con la excepción del



valenceno, en el que si se observa una disminución del porcentaje de adsorción.

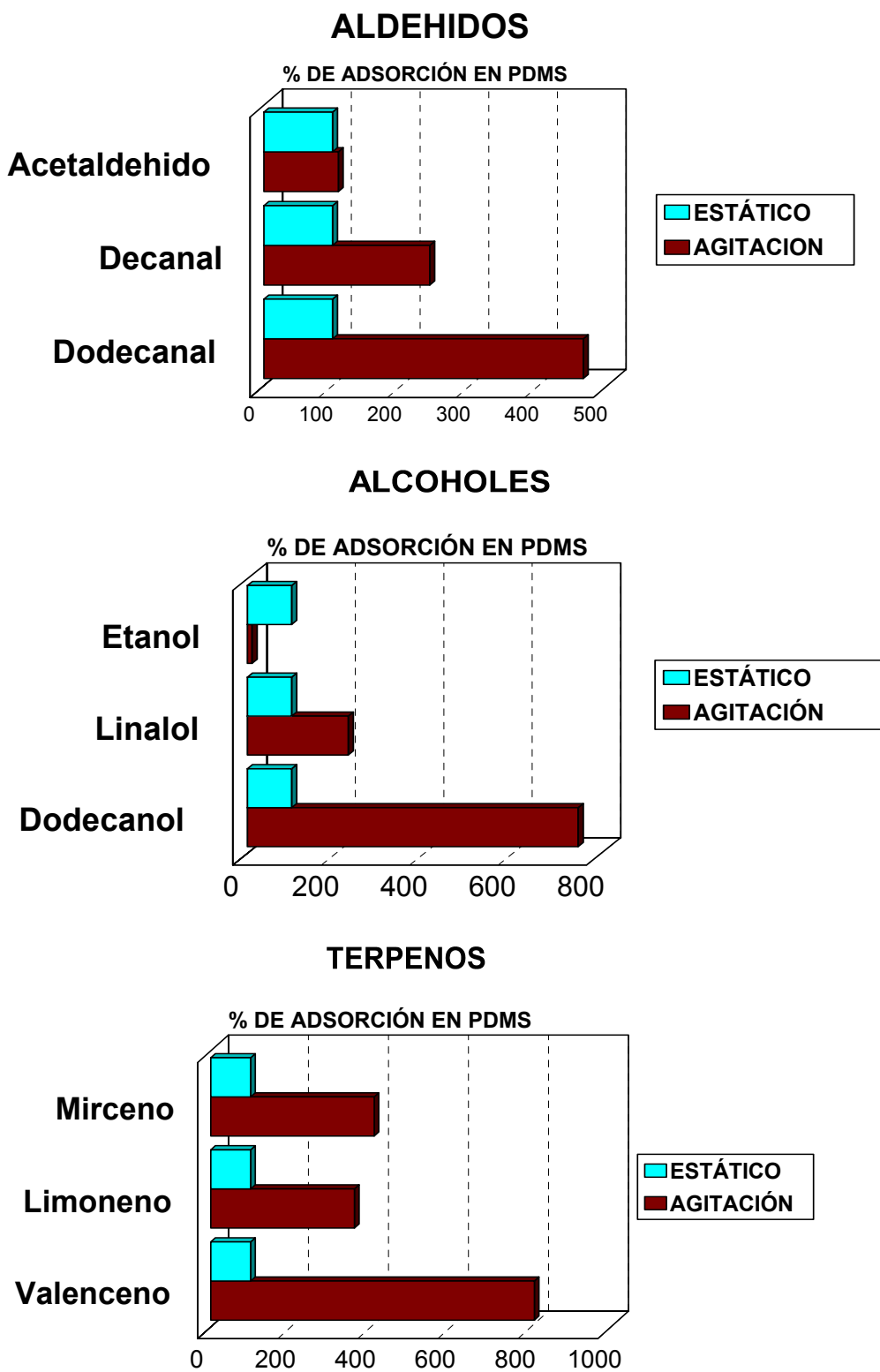
#### IV.2.3.- Efecto de la agitación

Estudios realizados por Penton en 1996 demuestran que la agitación de la muestra es bastante efectiva, ya que incrementa la respuesta de compuestos de baja volatilidad, aunque no es necesario para los componentes más volátiles. Arthur *et al.* (1992) afirman que la agitación reduce el tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza para alcanzar el equilibrio químico entre las fases que conforman el sistema.

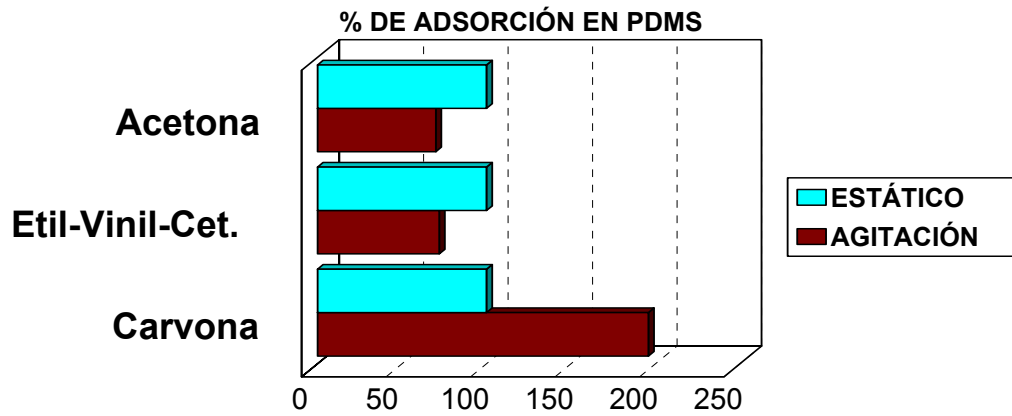
En nuestro caso, estudiamos únicamente el efecto de la agitación sobre la cantidad extraída de cada uno de los componentes por la fibra en un tiempo determinado de exposición al espacio de cabeza. Al igual que Penton en 1996, se determina un efecto positivo de la agitación sobre el atrapamiento de los componentes menos volátiles. La agitación favorece la salida de éstos desde el zumo hacia el espacio de cabeza ya que, según lo expresado por Arthur *et al.* en 1992, los compuestos de mayor peso molecular tienen una difusión lenta en la fase acuosa que repercute negativamente en su velocidad de distribución hacia el espacio de cabeza.

No obstante todo ello, un hecho a destacar es que la agitación afecta negativamente a la distribución de los componentes más volátiles entre el espacio de cabeza y la fibra, tal es el caso de acetona, etanol y acetato de etilo, componentes muy volátiles que asombrosamente merman su adsorción de modo considerable por efecto de la agitación, tal como se muestra en la Figura IV.2.-3.

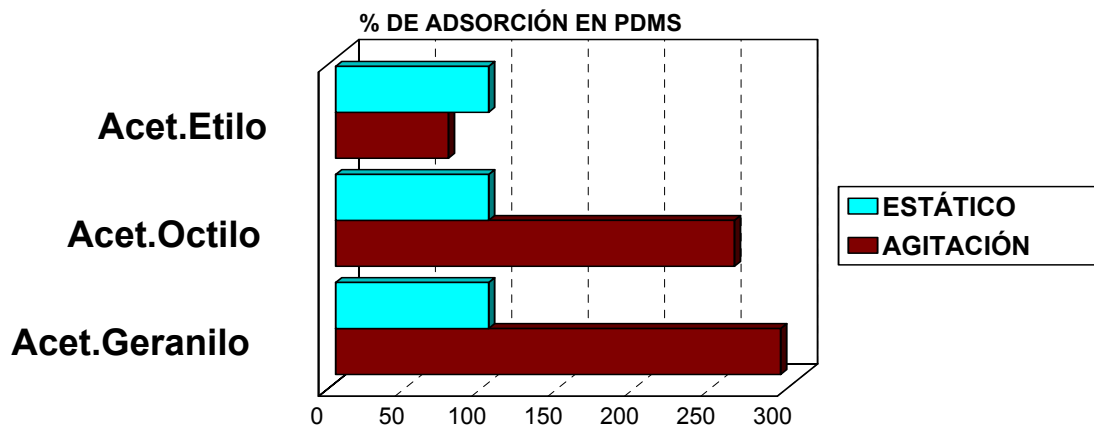
Fig.IV.2.3.- EFECTO DE LA AGITACIÓN SOBRE LA ADSORCIÓN EN PDMS



### CETONAS



### ESTERES



En base al conjunto de estos resultados obtenidos en el estudio del efecto de la concentración salina, el calentamiento y la agitación de la muestra, deducimos que para un mejor conocimiento de la composición de la fracción aromática en el espacio de cabeza, resulta más aconsejable la adición de la disolución saturada de ClNa, eliminando la agitación y el aumento de la temperatura. Estos resultados coinciden con los publicados por Steffen y Pawliszyn en 1996, quienes encuentran un aumento considerable de la sensibilidad del método solamente con la adición de sal.

#### **IV.2.4.-Tiempos de equilibrio**

El equilibrio químico-físico del sistema se alcanza cuando la distribución de analitos permanece homogénea en las tres fases, siendo el paso limitante para alcanzar este reparto la diferente velocidad de difusión de cada uno de los mismos a través del sistema líquido-gas- recubrimiento de la fibra. Por esta razón, el tiempo para alcanzar este equilibrio ha de ser previamente determinado en al menos un grupo representativo de todos los compuestos en estudio.

La representación gráfica de la cantidad de analito extraída frente al tiempo, refleja una curva que define la transferencia de componentes desde la matriz acuosa hacia la fibra a través del espacio de cabeza. El tiempo a partir del cual la cantidad de analito retenida en la fibra permanece constante corresponde con el tiempo de equilibrio del sistema. En la práctica se define al tiempo de equilibrio como el tiempo al que la masa adsorbida por la fibra ha alcanzado el 90% de la capacidad total de retención de ese componente por el recubrimiento polimérico (Zhang y Pawliszyn, 1993).

El perfil de adsorción es característico de cada componente ya que este depende en gran medida de la polaridad y volatilidad del

mismo, propiedades que definen los valores de los dos distintos coeficientes de reparto.

Al igual que en los ensayos anteriores, los mismos catorce componentes son seleccionados para el estudio del tiempo de equilibrio teniendo en cuenta las características de volatilidad y polaridad de los mismos, de tal forma que enmarcasen el comportamiento del resto de componentes estudiados. Entre estos componentes, hemos de señalar la dificultad de manipulación del acetaldehído, componente de elevada volatilidad.

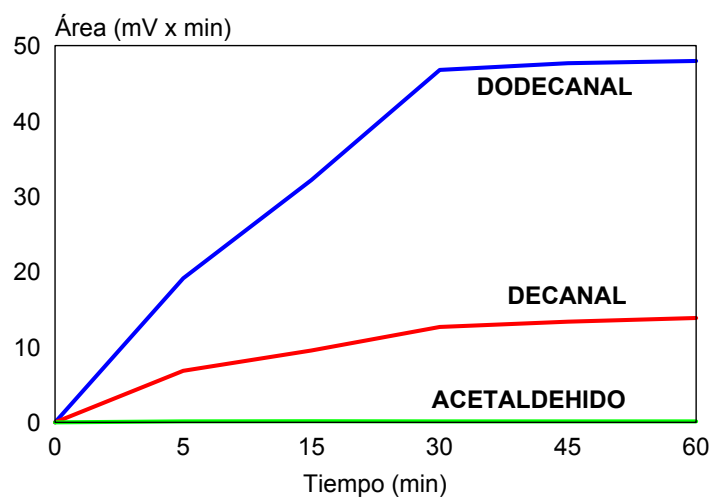
#### IV.2.4.1.- *Tiempos de equilibrio en PDMS*

Agrupando los componentes en base a su naturaleza química en aldehidos, alcoholes, terpenos, cetonas y ésteres, y representando el área obtenida para cada uno de ellos frente al tiempo de exposición de la fibra en espacio de cabeza, obtenemos las siguientes gráficas (Fig. IV.2.4.-1.) en las que se muestra el comportamiento de los diferentes compuestos ensayados y se registra el punto en el cual se alcanza el equilibrio.

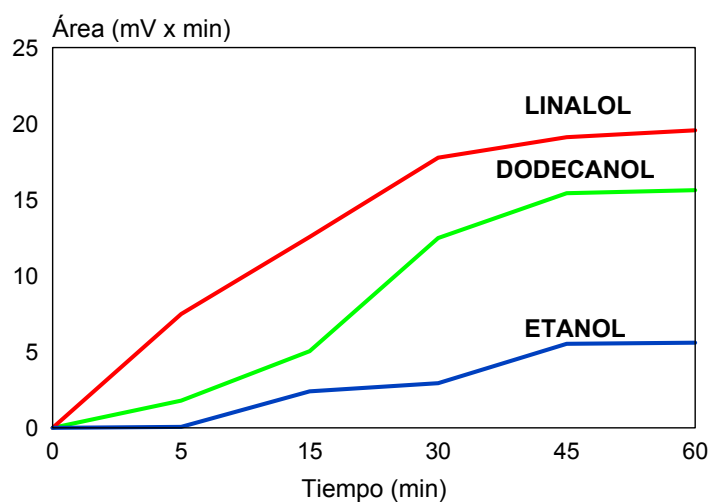
Un comportamiento general observado es la existencia de un tramo inicial de elevada pendiente seguido de un tramo de menor pendiente con la consiguiente disminución de la cantidad de masa adsorbida. Estudios realizados por Zhang y Pawliszyn (1993), demuestran la existencia de este mismo comportamiento en la adsorción de componentes volátiles. Estos autores denominan el punto de caída de la pendiente como “turning point”.

Fig.IV.2.4.-1.- TIEMPOS DE EQUILIBRIO CON FIBRA DE PDMS

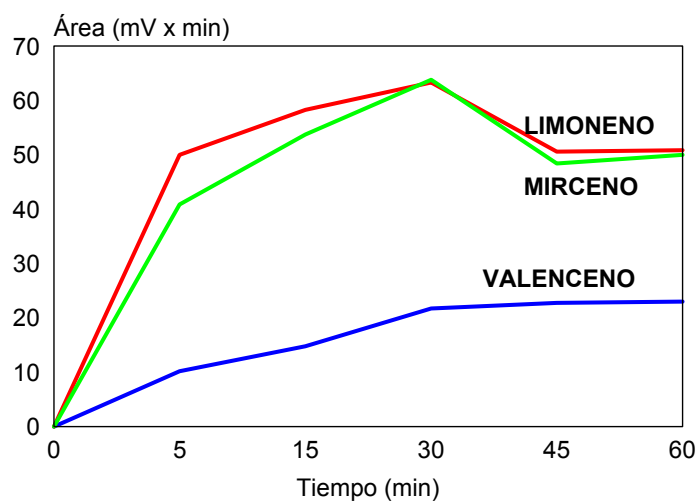
### ALDEHIDOS



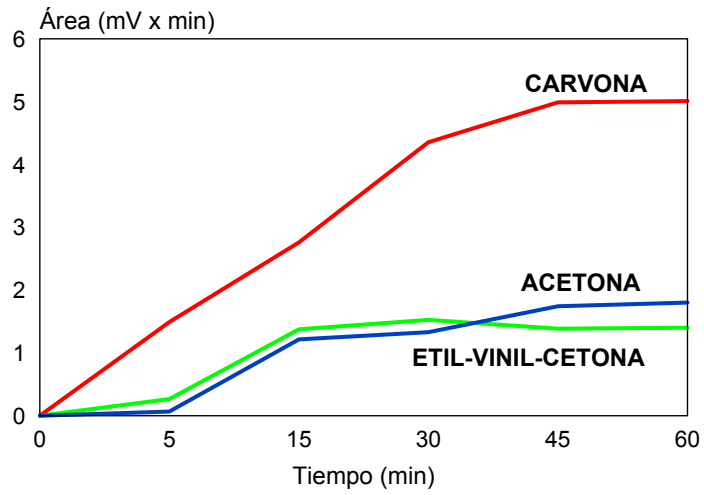
### ACOHOL



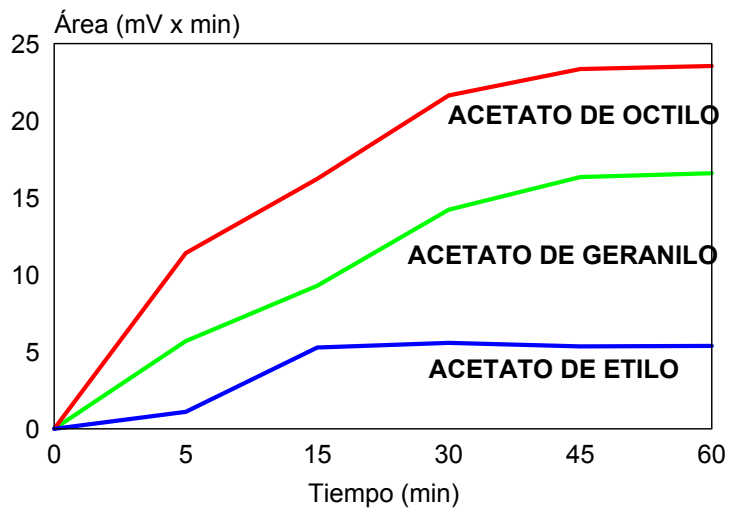
### TERPENOS



### CETONAS



### ÉSTERES



Este efecto se debe a la más rápida adsorción por parte de la fina capa del recubrimiento polimérico de los componentes presentes en el espacio de cabeza con respecto a la lenta difusión de los mismos desde la fase acuosa, que provoca un retardo en la salida hacia el espacio de cabeza con la consiguiente disminución de la cantidad de masa en disposición para ser adsorbida.

El perfil de adsorción de los aldehídos estudiados en el tiempo, muestra la incidencia del valor de las constantes de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza. En el caso del decanal, la curva obtenida apenas si modifica su pendiente entre los 5 y los 60 minutos estudiados, frente al dodecanal en el que se observa un aumento continuo de la cantidad de componente adsorbida entre los 5 y 30 minutos, a partir de este punto las curvas obtenidas alcanzan un plato, por lo que de acuerdo con lo estipulado por Zhang y Pawliszyn en 1993, ambos son componentes de bajo coeficiente de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza. En el caso de decanal dada su mayor volatilidad no puede apreciarse el punto definido por estos autores como punto de retardo, alcanzándose el tiempo de equilibrio a partir de los 30 minutos de exposición de la fibra. Para el dodecanal, dada su menor volatilidad y más lenta difusión hacia la fase gaseosa, el tiempo de retardo se observa claramente, siendo este prácticamente coincidente con el tiempo de equilibrio.

El acetaldehído es un componente de elevada volatilidad, lo que supone un gran problema en las condiciones de manejo; a esto se le une el hecho de ser un componente muy polar, por lo que la constante de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza es muy pequeño. Todo ello genera la escasa adsorción y la no existencia de cambio en la pendiente de la curva, por lo que podría deducirse que rápidamente alcanza el equilibrio en un tiempo inferior a los cinco minutos.

La adsorción de los alcoholes por el PDMS, presenta de igual forma un punto de retardo y un punto de equilibrio. El etanol es un



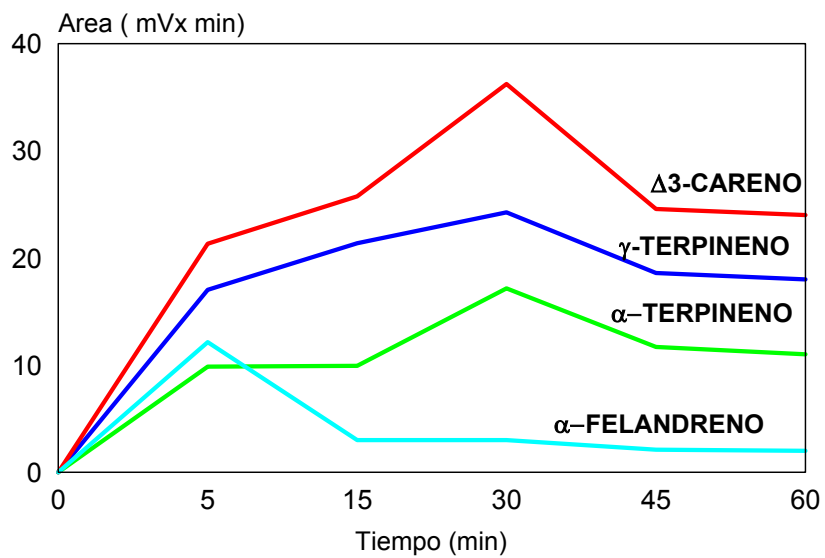
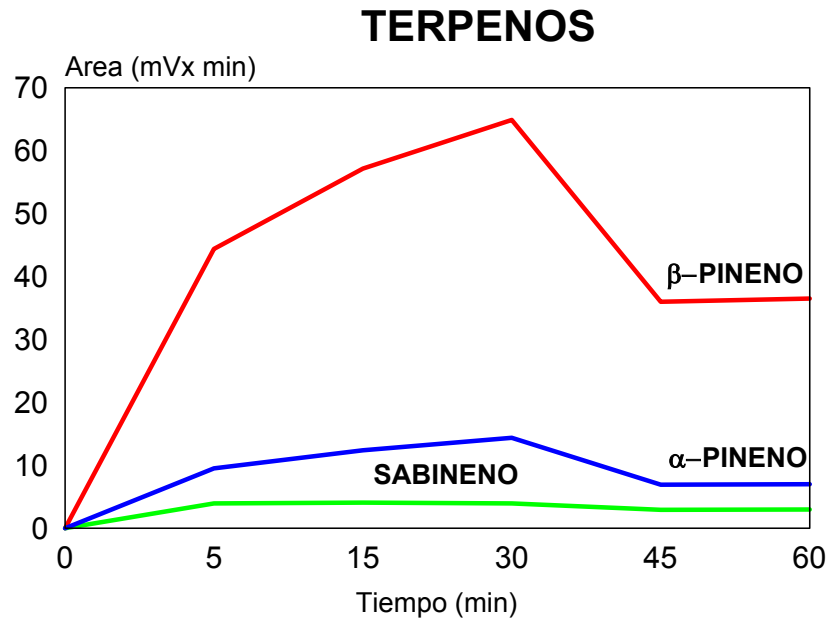
componente polar de elevada volatilidad y la afinidad que presenta hacia el PDMS es escasa. La adición de sal al medio que se aplica en la técnica modifica la constante de reparto de este componente entre la disolución acuosa y el espacio de cabeza, facilitando su salida y adsorción en la fibra. Por este motivo existe una lenta adsorción desde el inicio hasta los 5 minutos de exposición, a partir de este punto la adsorción aumenta -como consecuencia del enriquecimiento del espacio de cabeza en este componente- hasta alcanzar los 45 minutos de exposición, momento donde se alcanza el punto de retardo coincidente con el tiempo de equilibrio del mismo, dado el bajo coeficiente de reparto del etanol entre la fibra y el espacio de cabeza. En el caso del linalol y dodecanol ambos presentan el mismo tiempo de retardo pero no de equilibrio. El linalol alcanza el equilibrio próximo a los 30 minutos siendo este punto coincidente con el de equilibrio. Dodecanol, componente de menor volatilidad y polaridad también alcanza el punto de retorno próximo a los 30 minutos pero este punto no es coincidente con el tiempo de equilibrio, dato explicable por la lenta difusión de este en el medio acuoso y la mayor constante de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza por motivos de afinidad.

Los hidrocarburos terpénicos son componentes de naturaleza apolar y volatilidad media, por lo que presentan una adecuada afinidad por la fibra. La constante de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza es elevada, no siendo así en el caso del coeficiente de reparto entre la matriz de la muestra y el espacio de cabeza. El mecanismo de adsorción es diferente al del resto de componentes estudiados. En el caso de mircenol y limoneno, se observa una elevada pendiente hasta alcanzar los 30 minutos; a partir de este momento, y como consecuencia de la lenta difusión de analitos hacia el espacio de cabeza, la cantidad de analito adsorbido disminuye hasta alcanzar el equilibrio a los 45 minutos de exposición. Este fenómeno de disminución se corresponde con una desorción de analitos por parte de

la fibra, dato explicable si se consideran posibles interacciones entre componentes en el recubrimiento polimérico: la existencia de una competencia por los sitios activos de la superficie de adsorción pudiera justificar este comportamiento, ocurriendo al inicio una elevada retención como consecuencia de la gran afinidad, seguida de una desorción de los mismos hasta alcanzar el equilibrio en el sistema. Estos resultados nos instan al estudio del comportamiento del resto de los componentes de igual naturaleza química (Fig.IV.2.4.1.-1), de este análisis concluimos que este fenómeno es extensible a todos los hidrocarburos terpénicos analizados en el zumo de naranja. Este hecho no es tan marcado en el caso del valenceno, cariofileno y  $\alpha$ -humuleno, componentes de naturaleza poliaromática y lenta difusión a través del sistema de fases, en los que el punto de retardo coincide con el punto de equilibrio, siendo próximo a los 35 minutos.

En el estudio de la retención de las cetonas, acetona y etil-vinil-cetona presentan comportamientos próximos hasta los 30 minutos de exposición, aunque etil-vinil-cetona alcanza el punto de retardo a los 15 minutos, seguido de un tramo de menor pendiente en la que puede afirmarse que este componente alcanza el equilibrio al mismo tiempo que su punto de retardo. La acetona alcanzados los 30 minutos de exposición experimenta un aumento en la adsorción hasta los 45 minutos, a partir de este valor de tiempo la pendiente de la curva se anula, habiendo alcanzado en este punto el tiempo de equilibrio para este componente. Para el caso de la cetona aromática, carvona, el punto de retardo se alcanza a los 45 minutos, que coincide con el tiempo de equilibrio pues también en este punto la gráfica comienza a mantener constante el área bajo la curva.

Fig.IV.2.4.1.-1.- TIEMPOS DE EQUILIBRIO EN HIDROCARBUROS TERPÉNICOS PARA PDMS



En relación a los ésteres dada la diferencia de polaridad y volatilidad entre estos componentes, también se determina un comportamiento distinto entre los mismos. En el caso del acetato de etilo, el éster de mayor volatilidad de entre los estudiados, podemos apreciar que el punto de retardo es coincidente con el tiempo de equilibrio. Dada su escasa afinidad hacia el PDMS a los 15 minutos de exposición se alcanza la máxima capacidad de adsorción de ese componente por parte de la fibra. Los acetatos de octilo y geranilo, por su menor volatilidad y polaridad necesitan más tiempo para alcanzar el punto de equilibrio como consecuencia de una mayor constante de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza, alcanzándose este punto a los 45 minutos de exposición, no siendo coincidente con el tiempo de retardo, que en ambos componentes es coincidente y se alcanza aproximadamente a los 30 minutos de exposición.

De los resultados obtenidos se deduce que en el estudio de los componentes volátiles en el zumo de naranja mediante HS-SPME con PDMS como recubrimiento polimérico, la mayoría de los componentes tienen valores bajos en las constantes de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza, por lo que el tiempo de retardo es coincidente con el de equilibrio que para componentes de elevada volatilidad, caso de acetaldehído, etil-vinil-cetona y acetato de etilo, son próximos a los 15 minutos. Un comportamiento similar es el observado para decanal, dodecanal y linalol, en los que también son coincidentes ambos puntos que se alcanzan a los 30 minutos, junto con carvona, acetona y etanol en los que se requiere un tiempo superior, próximo a los 45 minutos. Componentes de mayor afinidad, como hidrocarburos terpénicos de bajo peso molecular y dodecanol, acetato de octilo y acetato de geranilo presentan tiempos de retardo no coincidentes con los de equilibrio, alcanzándose estos últimos próximos a los 45 minutos de exposición.

En base a esto, el tiempo óptimo de exposición de la fibra de PDMS en el espacio de cabeza del zumo de naranja para obtener una adecuada cuantificación es de 45 minutos, en este punto todos los componentes analizados han alcanzado las condiciones de equilibrio entre fases.

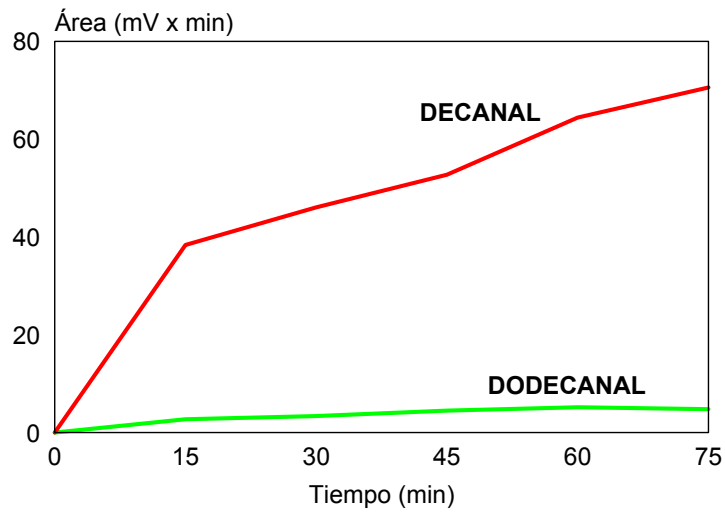
#### IV.2.4.2.- *Tiempos de equilibrio en PA*

Dadas las características fisico-químicas del poliacrilato (sólido cristalino), el tiempo requerido para alcanzar la uniformidad de las concentraciones en el equilibrio es superior al polidimetil-siloxano, como consecuencia del mayor tiempo requerido para difundir en esta fase sólida los componentes volátiles. Esta fibra, como se ha definido anteriormente, es específica para componentes de naturaleza polar, por lo que, a priori, se mejorará la extracción de los mismos disminuyendo, por el contrario con los de naturaleza apolar.

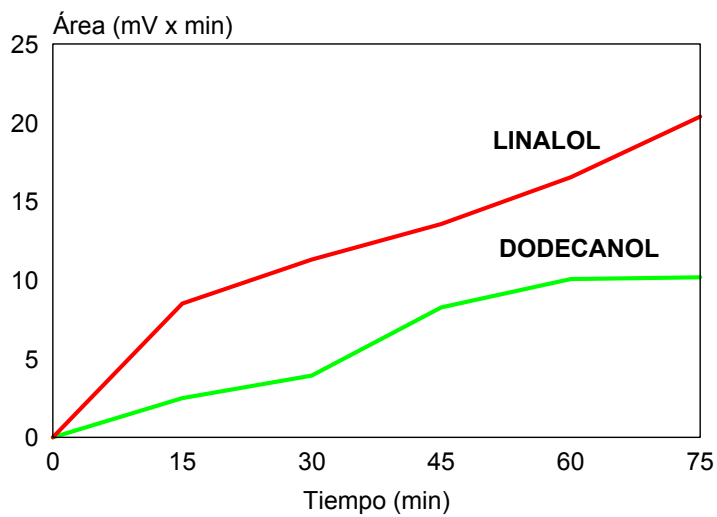
Los resultados de esta experimentación, paralela a la anteriormente realizada con la fibra de PDMS, se recogen en las gráficas de la Figura IV.2.4.-2., que a continuación se describen.

El estudio de los aldehidos nos remarca la importancia de la polaridad y volatilidad sobre la capacidad de adsorción del PA. La evolución de la cantidad adsorbida de decanal comienza con un crecimiento continuo sin llegar a alcanzar el tiempo de equilibrio a los 75 minutos de exposición. Frente al dodecanal -en este caso la afinidad del recubrimiento polimérico hacia este componente es bastante escasa- la cantidad retenida es muy pequeña, representando una curva de mínima pendiente. El tiempo mínimo que ha de mantenerse la fibra en el espacio de cabeza está próximo a los 60 minutos. Contrasta como el comportamiento de ambos componentes en los dos recubrimientos de fibra estudiados es inverso.

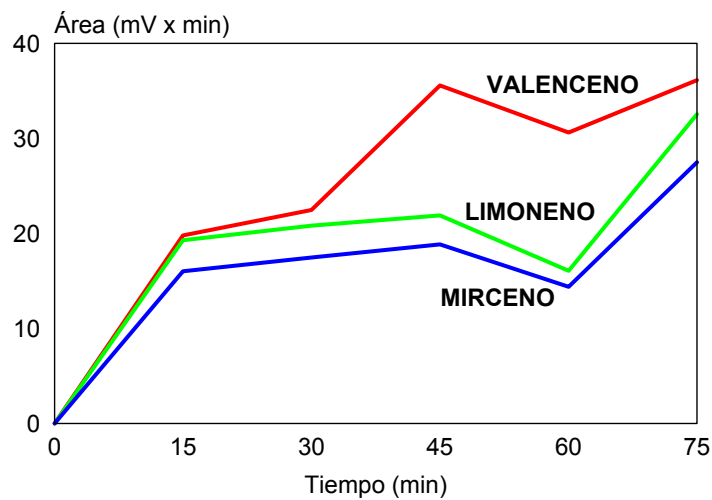
Fig. IV.2.4.-2. TIEMPOS DE EQUILIBRIO EN PA  
**ALDEHIDOS**



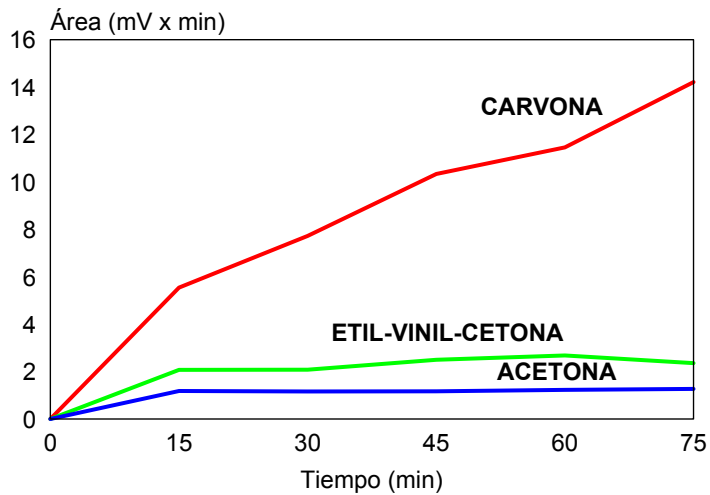
**ALCOHOLES**



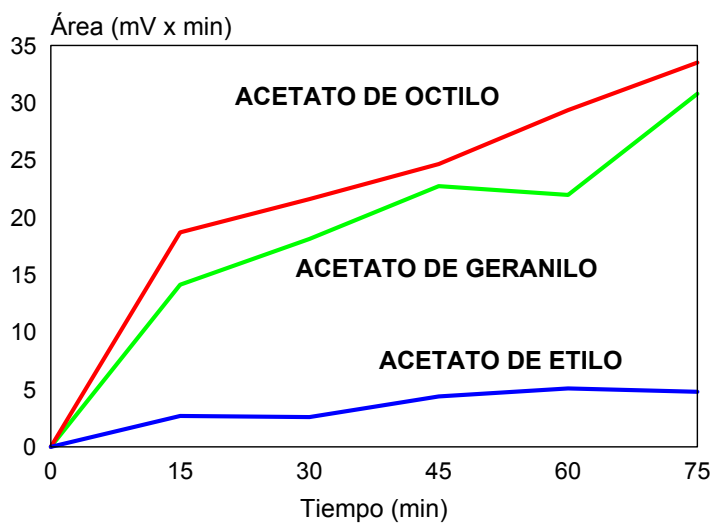
**TERPENOS**



### CETONAS



### ÉSTERES



En PDMS mayor cantidad de dodecanal se adsorbe, mientras que el decanal alcanza rápidamente el punto de equilibrio (30 min).

El perfil de la velocidad de adsorción de los alcoholes en PA muestra en el caso del linalol una elevada constante de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza, la afinidad de la fibra hacia el componente es bastante elevada, lo cual condiciona que no se alcance el equilibrio de absorción ni a los 75 minutos de exposición de la fibra en esta técnica de espacio de cabeza.

En el caso del dodecanol, componente de menor volatilidad y polaridad que el anterior, el tiempo de equilibrio es coincidente con el tiempo de retardo pues a los 60 minutos de exposición de la fibra al espacio de cabeza alcanza la cantidad máxima de componente que es retenida por el recubrimiento de PA.

En relación al comportamiento de adsorción en ambas fibras, el dodecanol presenta una actuación similar próxima con la salvedad del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, dada la propia naturaleza del mecanismo de adsorción. Con relación al linalol, si que puede apreciarse la influencia de la polaridad del recubrimiento de la fibra con su afinidad hacia los componentes de mayor polaridad.

Los terpenos, dada su naturaleza apolar, son menos retenidos por el PA y se destaca el comportamiento peculiar de la dinámica de absorción, ya que hasta los 45 minutos aumenta la cantidad retenida produciéndose un descenso en torno a 60 minutos y vuelve aumentar a los 75 minutos. En estas condiciones podríamos decir que en el punto donde ocurre una desorción parcial puede ser considerado el hecho de la adsorción competitiva de otros componentes de mayor afinidad y más lenta difusión a través del sistema. A excepción del valenceno, en el que el comportamiento es distinto ya que las variaciones detectadas son mucho más intensas y se alcanzan a menor tiempo que limoneno y



mirceño. En estas condiciones no podemos hablar de equilibrio, ya que no ha sido alcanzado en los tiempos de exposición considerados.

En el caso de las cetonas, tanto la acetona como la etil-vinil-cetona presentan una elevada volatilidad y ligera polaridad, su coeficiente de reparto entre la fibra y el espacio de cabeza es pequeño, por este motivo alcanzan rápidamente el tiempo equilibrio que a su vez es coincidente con el punto de retardo.

Un hecho a destacar es el diferente comportamiento de estos compuestos en ambas fibras, en el caso de la fibra apolar el tiempo de retardo no coincide con el tiempo de equilibrio, dada la diferencia de polaridad existente entre ambas, que modifica su coeficiente de reparto fibra-espacio de cabeza. La carvona presenta un comportamiento en el que el equilibrio no se alcanza en todo el tiempo de exposición, como consecuencia de su escasa polaridad y menor volatilidad, que se traduce en una lenta difusión a través del sistema. Otro hecho que ha de ser constatado es el posible valor elevado del coeficiente de reparto en el segundo equilibrio del sistema, por lo que requiere un elevado tiempo de exposición en el espacio de cabeza para poder alcanzar el equilibrio. Un comportamiento opuesto al encontrado en PDMS, en el que el punto de retardo coincide con el tiempo de equilibrio debido al bajo coeficiente de reparto en el segundo equilibrio.

Los ésteres presentan un comportamiento diferente a los componentes anteriormente mencionados. En el caso del acetato de etilo, dada su elevada volatilidad y bajo coeficiente de reparto hacia el PA, alcanza el equilibrio en torno a los 60 minutos, frente al acetato de octilo en el que durante los 75 minutos de exposición no se produce en ningún momento el equilibrio, y el acetato de geranilo tiene un comportamiento similar al de terpenos, crecimiento rápido hasta los 45 estabilidad hasta los 60 y crecimiento brusco hasta los 75 minutos.

Como se ha definido anteriormente el PA es una fibra de naturaleza muy polar y específica, adecuada para determinar componentes volátiles de elevada polaridad y volatilidad, por lo que el tiempo de equilibrio a considerar para la determinación de volátiles es el encontrado para los componentes con estas características. Por ello el tiempo óptimo de exposición del PA en espacio de cabeza es de 60 minutos.

#### IV.2.5.- Tiempos de adsorción

La diferencia de tiempos de equilibrio encontradas entre el PDMS y el PA son debidas en su mayor parte a la diferente estructura química de estos polímeros al presentar el poliacrilato estructura cristalina la difusión a través del mismo es mucho más lenta que para el polidimetilsiloxano de naturaleza fluida; junto al hecho de que la mayoría de los componentes volátiles en el zumo de naranja son de naturaleza polar, por lo tanto una mayor afinidad que se traduce en una elevada constante de reparto entre el recubrimiento polimérico y el espacio de cabeza, requiriendo más tiempo para alcanzar el equilibrio entre fases.

Estudios realizados por Steffen y Pawliszyn (1996) en los que se compara la actuación de estos dos tipos de fibra en algunos componentes volátiles característicos del zumo de naranja, demuestran que cada una de estas fibras posee ventajas particulares. En el caso del PDMS, es eficiente para la extracción de un amplio rango de analitos independientemente de su polaridad aunque, a excepción de los terpenos, el resto de analitos que estudian son extraídos proporcionalmente en mayor cantidad mediante PA. Estos resultados coinciden con los publicados por Boy-Boland *et al.*, (1994), quienes afirman la efectividad de PA para la extracción de componentes de diferente naturaleza química.

Steffen y Pawliszyn (1996), respecto al tiempo de equilibrio encuentran una gran homogeneidad de resultados con el empleo de PA. Para ellos la mayoría de los componentes presentes en el espacio de cabeza del zumo de naranja alcanzan el equilibrio próximo a los 60 minutos, dato no coincidente con nuestros resultados, en los que los tiempos requeridos para la mayoría de los componentes sobrepasan los 75 minutos. No obstante, en relación a los tiempos seleccionados para optimizar la exposición de PDMS, si que son coincidentes con los adoptados por estos autores.

Esto nos lleva a la conclusión de que el menor coeficiente de reparto de los analitos entre las tres fases que conforman el sistema con el empleo de PDMS como recubrimiento polimérico, favorece la determinación cuantitativa de los componentes volátiles que conforman el espacio de cabeza del zumo de naranja. Una mayor homogeneidad en los tiempos de exposición de la fibra en el espacio de cabeza supone una mayor reproducibilidad de resultados, así como un menor tiempo necesario para realizar las determinaciones.

El empleo de PA supone la consideración de tiempos de exposición favorables para los componentes muy volátiles de bajo coeficiente de reparto, con lo que el estudio a nivel cuantitativo no es el óptimo en la determinación de la composición en espacio de cabeza en el zumo de naranja.

En base a estos resultados, considerando la dificultad de alcanzar los tiempos de equilibrio óptimos para cada uno de los componentes volátiles con el empleo de ambos recubrimientos poliméricos, tomamos la consideración de tiempos de exposición favorables de los recubrimientos poliméricos en el espacio de cabeza, siendo de 45 minutos para PDMS y de 60 para PA.

### **IV.3.- ANÁLISIS DE COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA**

En este apartado realizamos el análisis de los componentes volátiles totales y en espacio de cabeza característicos del zumo de naranja. Para ello, también se compara el zumo obtenido a partir de un exprimido a mano y el zumo simple de naranja pasteurizado elaborado industrialmente, con el fin de contrastar las variaciones sufridas por los constituyentes volátiles mediante procedimientos mecánicos y los tratamientos iniciales de refinado, desaireado y pasteurizado a los que queda sometido.

Hoy en día, para un sector de mercado selecto, estas dos modalidades de zumo de naranja son las más demandadas por los consumidores al estar disponibles en el mercado y apreciar las diferencias de flavor existentes entre las mismas.

#### **IV.3.1.- Componentes volátiles. SDE**

El aroma fresco de los zumos recién exprimidos a partir de los frutos cítricos sufre transformaciones por los tratamientos térmicos a que se someten durante el procesado industrial (Núñez, 1988; Shaw, 1986).

Para poder interpretar mejor estas modificaciones y/o apreciar las diferencias existentes entre el zumo exprimido a mano y el zumo industrial es necesario conocer la composición y cantidades de constituyentes volátiles en ambos zumos.

Durante el período de elaboración comprendido entre los meses de enero a mayo, se recogen en fábrica doce muestras representativas de los frutos que industrializa en cada momento así como las muestras respectivas del zumo pasteurizado que se elabora simultáneamente en fábrica.

La totalidad de los componentes aromáticos considerados en este estudio se comentan en los siguientes apartados para cada una de las muestras agrupadas según el tipo del zumo, tabulando la cuantificación de los mismos.

#### IV.3.1.1.- Zumo de naranja exprimido a mano

De nuevo se describen los resultados referidos a los distintos constituyentes volátiles analizados (Tabla.IV.3.1.-1.), en base a su naturaleza química.

*Aldehidos.*- Muchos de los componentes que consideramos en esta Memoria no son detectados como consecuencia de su baja concentración y escasa recuperación durante la destilación. Tal es el caso del acetaldehído y el trans-2-hexenal, componentes volátiles característicos del aroma fresco de la naranja, así como el furfural que contribuye al desarrollo de olor desagradable y se considera como índice de degradación del zumo fresco. Undecanal y dodecanal componentes de alto peso molecular tampoco son detectados.

Entre los aldehídos encontrados destacan el valeraldehído y el hexanal como mayoritarios. Otros aldehídos característicos como el decanal, octanal, nonanal, neral y geranial se detectan a muy bajas concentraciones durante el mes de enero disminuyendo en las muestras de abril, pero no son detectados en las muestras correspondientes al mes de mayo.

**Tabla IV.3.1.-1.- COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN ZUMO DE NARANJA EXPRIMIDO A MANO**

Componentes (mg/Kg)	Naranja Exprimida		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehído.	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	0,190 ± 0,329
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	4,246 ± 2,261	0,830 ± 0,632	N.D.
Valeraldehído+2 Pentanol	2,235 ± 1,595	0,701 ± 0,557	N.D.
Butirato de metilo	0,312 ± 0,063	0,037 ± 0,059	N.D.
3-metil-1-butanol	N.D.	0,050 ± 0,081	0,055 ± 0,095
Hexanal+Butirato de etilo	1,178 ± 0,656	0,691 ± 0,523	0,677 ± 0,384
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	0,158 ± 0,003	0,145 ± 0,039	0,172 ± 0,066
1-Heptanol	0,031 ± 0,054	0,005 ± 0,013	0,013 ± 0,022
Sabineno	0,105 ± 0,049	0,030 ± 0,039	0,088 ± 0,116
β-Pineno	0,018 ± 0,02	N.D.	N.D.
β-Mirceno	0,910 ± 0,567	0,423 ± 0,221	0,722 ± 0,234
Octanal	0,26 ± 0,450	0,044 ± 0,063	N.D.
α-Felandreno	N.D.	0,018 ± 0,029	N.D.
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,079 ± 0,068	0,012 ± 0,022	N.D.
α-Terpineno	0,045 ± 0,058	N.D.	0,013 ± 0,022

<b>Limoneno</b>	58,750 ± 37,257	33,554 ± 7,773	48,789 ± 22,722
<b>γ-Terpineno</b>	0,030 ± 0,052	N.D.	0,098 ± 0,058
<b>Octanol</b>	0,270 ± 0,303	0,041 ± 0,044	0,405 ± 0,353
<b>Linalol</b>	0,579 ± 0,730	0,219 ± 0,102	0,366 ± 0,090
<b>Nonanal</b>	0,009 ± 0,012	N.D.	N.D.
<b>Citronelal</b>	0,031 ± 0,054	N.D.	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,450 ± 0,504	0,188 ± 0,104	0,216 ± 0,086
<b>α-Terpineol</b>	0,412 ± 0,595	0,310 ± 0,454	0,313 ± 0,292
<b>Decanal</b>	0,020 ± 0,034	0,066 ± 0,067	N.D.
<b>Acetato de octilo</b>	N.D.	0,011 ± 0,018	N.D.
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,085 ± 0,130	0,012 ± 0,083	0,155 ± 0,269
<b>Carveol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Neral</b>	0,014 ± 0,020	0,007 ± 0,018	N.D.
<b>Carvona</b>	N.D.	0,002 ± 0,006	0,147 ± 0,221
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,057 ± 0,054	0,037 ± 0,053	N.D.
<b>Geranial</b>	N.D.	N.D.	0,143 ± 0,232
<b>Perialdehido</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Undecanal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo.</b>	N.D.	N.D.	0,027 ± 0,034
<b>Acet. nerilo</b>	0,027 ± 0,046	0,002 ± 0,005	0,007 ± 0,012
<b>Acet. geranilo</b>	N.D.	0,001 ± 0,002	N.D.
<b>Dodecanal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,031 ± 0,032	0,059 ± 0,056	0,058 ± 0,056
<b>α-Humuleno</b>	N.D.	0,012 ± 0,030	N.D.
<b>Dodecanol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	2,257 ± 2,459	1,921 ± 2,220	2,660 ± 2,269

*Alcoholes.*- De los quince componentes alcohólicos estudiados, seis no han sido detectados: etanol, 1-butanol, 1-penten-3-ol, trans-2-hexen-1-ol, carveol y dodecanol.

Metanol y etanol son componentes volátiles característicos de la naranja procedentes de frutos muy maduros. Estudios realizados por Nisperos-Carriedo y Shaw (1990) confirman la detección de una cantidad elevada de metanol en zumo exprimido a mano como consecuencia de la actuación de la pectínmetilesterasa, enzima que produce la desesterificación de las pectinas presentes en el zumo, con la consiguiente liberación de metanol.

La no detección de estos componentes es debida a su elevada volatilidad, lo que conlleva la pérdida de los mismos durante la concentración del destilado, al ser estos de volatilidad próxima a la del hexano.

El trans-2-hexen-1-ol está considerado como un importante contribuyente al toque herbáceo en el zumo fresco de naranja (Arctander, 1969); su escasa afinidad hacia el hexano y la baja concentración a la que ha sido detectado (0,02 ppm) por Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), explican la no detección de este componente mediante el método de extracción-destilación simultánea.

Linalol, terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol son los componentes detectados en mayor concentración. El linalol está presente en cantidades variables en la corteza de la naranja (Shaw, 1979). En los estudios realizados por Nisperos-Carriedo y Shaw, en 1990, encuentran que este componente se haya en el zumo fresco de naranja únicamente a nivel de trazas, mientras que en nuestros resultados la concentración detectada oscila entre 0,58 y 0,22 ppm.

El  $\alpha$ -terpineol, es un compuesto procedente de la degradación del limoneno (componente mayoritario del aceite esencial de la naranja), siendo conocida su contribución al desarrollo del olor desagradable en el zumo de naranja cuando su concentración es superior a 2ppm



(Tatum *et al.*, 1975). En nuestras muestras la concentración en el zumo exprimido a mano oscila entre 0,41 y 0,31 ppm.

*Hidrocarburos terpénicos.*- El estudio de la concentración de estos terpenos, resulta mucho más adecuada como consecuencia de la mayor afinidad hacia el hexano y su menor volatilidad. Estos componentes están presentes en el aceite esencial de la corteza del fruto y se eleva su contenido por la incorporación de aceite en los equipos mecánicos de extracción.

Doce componentes son recuperados, de los cuales limoneno, valenceno y mirceno son detectados en mayor concentración. El limoneno es el componente mayoritario y oscila entre 48 y 58 ppm. Estudios realizados por Ahmed *et al.* (1978b) demuestran que el limoneno tiene un importante papel en el deterioro del aroma del zumo cuando su concentración está por encima de las 190 ppm, dato que concuerda con la posterior valoración sensorial realizada por Carter en 1985.

El  $\alpha$ -pineno con concentraciones comprendidas entre 0,15 y 0,17 ppm, ha sido considerado por Ahmed *et al.* (1978a) como un agente favorecedor del aroma del zumo. Estos valores son similares a los encontrados por Nisperos-Carriedo y Shaw en 1990 que detectan para la naranja fresca un contenido en  $\alpha$ -pineno comprendido entre 0,10 y 0,22 ppm.

En relación a sabineno y  $\gamma$ -terpineno, son detectados a una concentración comprendida entre 0,10 y 0,03 ppm. Estos componentes también han sido caracterizados por su contribución al aroma del zumo, aportando el  $\gamma$ -terpineno un aroma próximo al cítral, frente al sabineno de aroma más suave, especiado (Arctander, 1969).

$\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno y  $\Delta_3$ -careno se determinan a muy bajas concentraciones. Siendo  $\beta$ -pineno únicamente detectado en las muestras correspondientes al mes de enero, junto con  $\alpha$ -felandreno detectado en las muestras correspondientes al mes de abril.

*Esteres y Cetonas.*- De acuerdo con las características del sistema de destilación únicamente llegan a detectarse componentes de volatilidad igual o superior a la etil-vinil-cetona. Componentes como el acetato de etilo, característico del aroma frutal del zumo (Arctander, 1969), no se determinan como consecuencia de la pérdida durante la concentración del destilado.

El butirato de metilo también es un componente característico del aroma frutal, su concentración oscila entre 0,31 y 0,04 ppm durante los meses de enero y abril, pero no llega a detectarse en las muestras de mayo.

En el estudio de las cetonas destaca únicamente la etil-vinil-cetona como componente detectado en mayor cantidad (4,24-0,83 ppm); carvona, producto de degradación procedente de la hidrólisis catalítica del limoneno, es detectada durante los meses de abril y mayo (0,002 y 0,147 ppm, respectivamente), observando una elevación de la concentración con la maduración del fruto.

#### IV.3.1.2.- *Zumo de naranja comercial*

Una vez caracterizados los componentes volátiles más representativos del zumo exprimido a mano, se determinan de los mismos en una muestra de zumo de naranja pasteurizado de procedencia industrial.

En este caso ha de tenerse en cuenta el diferente sistema mecánico de extracción del zumo, junto a la influencia de todos los procesos tecnológicos a los que queda sometido el mismo. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla IV.3.1.-2.

*Aldehidos.*- De igual forma que en el zumo de naranja exprimido a mano tampoco llegan a detectarse los aldehidos de elevada volatilidad y escasa recuperación mediante SDE, caso de acetaldehido y trans-2-hexenal.

De los aldehidos detectados destacamos que el valeraldehido y el hexanal, presentan una disminución de concentración del rango de 2,5 hasta 12 veces con relación al valor determinado en el zumo exprimido a mano. Las menores concentraciones en estos componentes suponen una pérdida de notas del aroma fresco del zumo.

En relación a los aldehidos de mayor peso molecular y menor volatilidad, pero que a su vez también definen el aroma del zumo, como octanal, nonanal, decanal, neral y geranial, destaca el aumento importante de su concentración. Octanal y nonanal aumentan 3 y 53 veces respectivamente, resaltando un crecimiento progresivo durante los meses de enero, abril y mayo. Este dato no coincide con el obtenido en el zumo exprimido a mano donde nonanal únicamente se detecta en las muestras de enero a muy baja concentración.

El decanal, considerado como el aldehído mayoritario en la naranja, aumenta su concentración 25 veces con relación al detectado en el zumo fresco.

Octanal y decanal han sido considerados como importantes contribuidores al aroma de la naranja según lo expresado por Boelens y van Gemert en 1987, siendo uno de los estándares de identidad del aceite de la corteza. No obstante, Ahmed *et al.* (1978 a) encontraron que un contenido en decanal superior a 0,72 ppm ejerce un efecto negativo sobre la calidad del aroma del zumo de naranja. En nuestro estudio esta cantidad sólo es superada durante los meses de abril y mayo.

Tabla IV.3.1.-2.- COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN ZUMO DE NARANJA PASTEURIZADO

Componentes (mg/Kg)	Zumo Pasteurizado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	0,920 ± 1,490	0,630 ± 0,546	N.D.
Valeraldehido+2 Pentanol	0,66 ± 0,960	0,550 ± 0,477	N.D.
Butirato de metilo	N.D.	0,043 ± 0,038	N.D.
3-metil-1-Butanol	0,05 ± 0,001	0,105 ± 0,027	0,112 ± 0,003
Hexanal+Butirato de etilo	0,073 ± 0,002	0,061 ± 0,055	N.D.
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	0,053 ± 0,01	1,00 ± 0,293	1,077 ± 0,189
1-Heptanol	N.D.	0,022 ± 0,019	N.D.
Sabineno	0,063 ± 0,08	0,095 ± 0,084	0,109 ± 0,025
β-Pineno	0,109 ± 0,112	0,108 ± 0,024	0,215 ± 0,152
β-Mirceno	2,030 ± 3,267	3,703 ± 1,060	3,704 ± 0,325
Octanal	0,268 ± 0,213	0,280 ± 0,180	0,346 ± 0,147
α-Felandreno	N.D.	N.D.	N.D.
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,290 ± 0,123	0,250 ± 0,076	0,273 ± 0,058
α-Terpineno	0,066 ± 0,001	0,092 ± 0,080	0,088 ± 0,003

<b>Limoneno</b>	125,500 ± 98,32	220,366 ± 55,99	210,93 ± 35,587
<b>γ-Terpineno</b>	0,240 ± 0,145	0,322 ± 0,066	0,353 ± 0,173
<b>Octanol</b>	0,410 ± 0,258	0,780 ± 0,171	0,831 ± 0,475
<b>Linalol</b>	1,340 ± 0,965	2,318 ± 0,195	1,739 ± 0,952
<b>Nonanal</b>	0,100 ± 0,005	0,096 ± 0,087	0,281 ± 0,099
<b>Citronelal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,660 ± 0,325	1,129 ± 0,135	0,773 ± 0,520
<b>α-Terpineol</b>	0,520 ± 0,268	1,084 ± 0,303	1,201 ± 0,240
<b>Decanal</b>	0,330 ± 0,154	0,881 ± 0,370	0,878 ± 0,358
<b>Acetato de octilo</b>	N.D.	0,014 ± 0,025	N.D.
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,153 ± 0,009	0,241 ± 0,105	0,147 ± 0,022
<b>Carveol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Neral</b>	N.D.	0,066 ± 0,058	N.D.
<b>Carvona</b>	N.D.	0,445 ± 0,570	0,129 ± 0,250
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,081 ± 0,025	0,143 ± 0,033	0,163 ± 0,056
<b>Geranial</b>	0,142 ± 0,320	0,221 ± 0,024	0,248 ± 0,040
<b>Perialdehido</b>	N.D.	0,029 ± 0,050	N.D.
<b>Undecanal</b>	N.D.	0,041 ± 0,037	N.D.
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,028 ± 0,025	0,040 ± 0,048	N.D.
<b>Acet. nerilo</b>	N.D.	0,051 ± 0,044	0,181 ± 0,002
<b>Acet. geranilo</b>	0,038 ± 0,026	0,048 ± 0,043	N.D.
<b>Dodecanal</b>	0,094 ± 0,001	0,152 ± 0,086	0,156 ± 0,0006
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,027 ± 0,005	0,121 ± 0,005	0,110 ± 0,007
<b>α-Humuleno</b>	N.D.	0,041 ± 0,042	N.D.
<b>Dodecanol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	0,750 ± 1,253	5,330 ± 2,738	8,948 ± 5,863

Neral y geranial, aldehidos isómeros característicos de los frutos cítricos y especialmente limón, aumentan su concentración en un rango de 3,14 y 4,3 veces, con la peculiaridad de que el neral únicamente es detectado en el mes de abril, como consecuencia de las elevadas pérdidas durante el procesado, frente al geranial componente más estable y detectado durante todo el periodo de muestreo.

Perialdehido, undecanal y dodecanal, han sido cuantificados en contraste con su ausencia en las muestras exprimidas a mano.

Moshonas y Shaw en 1997 estudian el efecto de la pasteurización sobre el zumo fresco, estos autores encuentran en relación a octanal y decanal un aumento de concentración de los mismos en una proporción de 1,3 veces superior al detectado en el zumo fresco. Los valores obtenidos oscilan respectivamente entre 0,55 y 0,60 ppm, que relacionados con los obtenidos en nuestra experiencia 0,34 y 0,88 ppm suponen un incremento más representativo del efecto del procesado sobre el zumo fresco sin procesar.

En relación a neral y geranial los mismos autores no encuentran diferencias en su comportamiento y el efecto de la pasteurización apenas si es apreciado frente a los resultados obtenidos en esta experiencia.

*Alcoholes.*- De igual forma que en la naranja exprimida a mano tampoco son detectados aquellos componentes que no pueden ser extraídos mediante SDE, por lo que centramos el estudio en los alcoholes de menor volatilidad.

En el caso de 1-heptanol destaca una disminución importante de la concentración en el zumo pasteurizado; sólo en el mes de abril se detecta una concentración ligeramente superior en el zumo de naranja exprimida a mano respecto al zumo industrial.

Octanol y linalol se detectan en cantidades bastante superiores a las determinadas en el zumo exprimido a mano, con un aumento de 2,82 y 4,6 veces respectivamente. Estos resultados no son

coincidentes con lo publicado por Nisperos-Carriedo y Shaw en 1990, quienes detectan cantidades muy inferiores, llegando en ocasiones a ser considerados como componentes traza.

Terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol también son detectados en este caso en cantidades superiores, con un aumento aproximado de 3 veces para ambos. El aumento de la concentración del  $\alpha$ -terpineol está relacionado con el efecto del tratamiento térmico, ya que este componente procede del limoneno por la hidrólisis en el medio ácido del zumo que se favorece por el aumento de la temperatura (Slater y Watkins, 1964).

No se observan diferencias entre el contenido de nerol más citronelol en ambas muestras, con excepción de las muestras correspondientes al mes de abril, en las que el contenido en el zumo industrial superan en 10 veces las detectadas en el zumo exprimido a mano.

*Hidrocarburos terpénicos.-* Los componentes terpénicos presentes en el zumo de naranja proceden prácticamente en su mayor parte de la incorporación de aceite esencial durante la extracción. El exprimido en la industria lleva implícito la incorporación de este aceite presente en la corteza, lo que supone un aumento de la concentración de los mismos en el zumo industrial.

La concentración de los terpenos en el caso de  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno oscila entre 0,1 y 1ppm respectivamente, aumentando en diez veces su contenido en relación al zumo exprimido a mano, en el cual el  $\beta$ -pineno prácticamente se detecta a nivel de traza.

El  $\beta$ -mirceno junto con limoneno y valenceno, son los componentes terpénicos mayoritarios presentes en el aceite esencial de la naranja. La concentración de mirceno no presenta cambios significativos durante los meses de enero, abril y mayo, lo que no ocurre en el caso del valenceno, componente que aumenta su concentración a medida que aumenta el índice de madurez de la naranja.

Un dato a constatar es la diferencia de concentración existente entre el limoneno detectado en el zumo industrial y el detectado en el exprimido a mano. En este primer caso la concentración resulta ser 4 veces superior como consecuencia de la incorporación de aceite esencial procedente de la corteza durante en el equipo de extracción.

Sabineno,  $\alpha$ -felandreno,  $\Delta_3$ -careno,  $\alpha$ -terpineno, cariofileno y  $\alpha$ -humuleno, son componentes minoritarios en el aroma del zumo de naranja. El  $\alpha$ -felandreno no se detecta en nuestras muestras, y las concentraciones de  $\alpha$ -terpineno, cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y sabineno no superan en ninguna ocasión las 0,1 ppm.

*Esteres y Cetonas.*- Los ésteres son considerados como los contribuyentes al desarrollo del “top-note” en el aroma de los cítricos, en especial, acetato de etilo y butiratos de metilo y etilo (Aractander, 1969).

Dadas las características del método de extracción de los componentes volátiles, el acetato de etilo no se recupera, con lo cual en ninguna de las muestras estudiadas lo detectamos.

En relación a los butiratos de metilo y etilo su presencia es bastante escasa, detectándose el butirato de metilo únicamente en las muestras correspondientes al mes de abril con un nivel de concentración de 0,04 ppm.

La comparación de las concentraciones detectadas en el zumo de naranja exprimido a mano y el industrial, muestra la presencia de este componente en el zumo fresco recién exprimido en concentración superior respecto a la determinada en el zumo pasteurizado, lo cual demuestra el importante papel de estos componentes en el aroma fresco de la naranja, deteriorado por el procesamiento industrial.

Los ésteres de mayor peso molecular procedentes de la corteza de la naranja, se detectan en concentraciones muy pequeñas, siendo en algunos casos no determinada su presencia, como los acetatos de octilo y nerilo y el antranilato de etilo.



En relación a las cetonas, únicamente destacamos la presencia de etil-vinil-cetona, como componente de mayor volatilidad presente en el aroma de la naranja; su concentración oscila entre 0,6 y 0,9 ppm durante los meses de enero y abril, no encontrándose en el mes de mayo. La carvona -cetona de menor volatilidad e índice de degradación del zumo por efecto de la temperatura- no se detecta en las muestras procesadas durante el mes de enero, pero durante los meses de abril y mayo, se registran en concentraciones que oscilan entre 0,4 y 0,12 ppm, superior a veces a la concentración de otros componentes característicos del aroma frutal del zumo de naranja.

#### *IV.3.1.3.- Análisis estadístico*

El análisis estadístico de los datos obtenidos en ambos tipos de zumo se lleva a cabo mediante un análisis de varianza simple (test de homogeneidad de medias de Scheefe,  $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla IV.3.1.-3. Los valores recogidos en la Tabla representan la media de cada uno de estos grupos considerando el total de las muestras de zumo analizadas durante los meses de enero, abril y mayo.

Esto corrobora los resultados anteriormente comentados. Los datos que mejor reflejan las diferencias aromáticas existentes entre un zumo exprimido a mano y un zumo industrial determinados por la técnica SDE son los correspondientes a la incorporación de aceite esencial de la corteza de la naranja, rico en d-limoneno, durante el proceso de extracción del zumo.

Tabla IV.3.1.-3. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO EXPRIMIDO A MANO- ZUMO PASTEURIZADO EN SDE.**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H. TERPÉNICOS	CETONAS	ÉSTERES
ZUMO EXPR.	2,07 ± 1,51 <sup>a</sup>	1,41 ± 1,23 <sup>a</sup>	47,62 ± 25,51 <sup>a</sup>	1,65 ± 2,01 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,11 <sup>a</sup>
ZUMO PAST.	1,75 ± 1,06 <sup>a</sup>	4,74 ± 1,41 <sup>b</sup>	190,70 ± 72,14 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,79 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,12 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con índices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

#### IV.3.2.- Componentes volátiles. HS-SPME

El aroma del zumo fresco de la naranja está constituido por una mezcla compleja de componentes volátiles y en cantidades muy variables. Los métodos de extracción y/o recuperación de los componentes volátiles tradicionalmente empleados resultan ser poco precisos, lo que hace extremadamente difícil obtener una información cuantitativa exacta de los constituyentes que conforman el aroma.

En base a esto resulta necesario la aplicación de una técnica más rápida y simple que elimine estos problemas. La microextracción en fase sólida constituye un novedoso método analítico que ayuda a simplificar estos problemas y puede ser aplicada en la detección de componentes volátiles en espacio de cabeza en zumos cítricos tal como sugiere Zhang *et al.* en su estudio previo de 1994.

En este apartado estudiamos la composición en componentes volátiles en espacio de cabeza de muestras de zumo de naranja mediante SPME, aplicando dos tipos distintos de recubrimiento polimérico, uno de naturaleza apolar PDMS y otro de naturaleza polar PA., ensayados en la optimización del método de análisis. Con el estudio comparado del análisis cualitativo y cuantitativo, utilizando estos dos recubrimientos en la fibra, pretendemos valorar diferencias en la composición en componentes volátiles del espacio de cabeza de

los zumos de naranja exprimidos a mano y los de procedencia industrial (zumo pasteurizado).

#### *IV.3.2.1.- Zumo de naranja exprimido a mano.*

Al igual que en el caso de los componentes volátiles totales, para facilitar el estudio de la fracción aromática presente en el espacio de cabeza comentamos los componentes en base a su naturaleza química.

##### *IV.3.2.1.1.- Extracción mediante PDMS*

Los resultados obtenidos de estos análisis quedan reflejados en la Tabla IV.3.2.1.-1. Una visión general, a nivel cualitativo de los resultados obtenidos mediante esta técnica refleja que, en gran medida, los compuestos detectados son más numerosos que los encontrados mediante SDE.

*Aldehidos.-* Dadas las características que definen el método y teniendo en cuenta la volatilidad de los componentes, destacamos que a nivel cuantitativo la extracción queda favorecida para aquellos componentes de elevada volatilidad y polaridad media.

Destaca que, al igual que en el análisis de componentes volátiles totales por SDE los aldehidos mayoritarios detectados son valeraldehido y hexanal con concentraciones en el espacio de cabeza que oscilan entre 0,1 ppm y 1ppm.

Tabla IV.3.2.1.-1.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA EXPRIMIDO A MANO. HS-SPME (PDMS).**

Componentes (mg/Kg)	Naranja exprimida		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	0,020 ± 0,028	N.D.
Etanol	0,105 ± 0,181	0,284 ± 0,635	0,392 ± 0,491
Acetona	39,049 ± 13,930	24,616 ± 8,919	45,878 ± 11,924
Metil-vinil-cetona	13,976 ± 24,208	1,378 ± 3,081	N.D.
Acetato de etilo	0,530 ± 0,468	0,907 ± 0,302	0,863 ± 0,587
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	0,061 ± 0,136	N.D.
Etil-vinil-cetona	2,437 ± 1,732	0,864 ± 0,721	2,209 ± 1,819
Valeraldehido+2 Pentanol	0,231 ± 0,130	0,146 ± 0,095	0,280 ± 0,305
Butirato de metilo	0,023 ± 0,022	0,030 ± 0,034	0,065 ± 0,098
3-metil-1-Butanol	0,130 ± 0,225	N.D.	0,386 ± 0,533
Hexanal+Butirato de etilo	0,988 ± 0,292	1,042 ± 0,626	0,647 ± 0,215
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,013 ± 0,023	0,084 ± 0,046	0,038 ± 0,034
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	0,037 ± 0,052	0,015 ± 0,031
α-Pineno	0,092 ± 0,046	0,073 ± 0,022	0,077 ± 0,021
1-Heptanol	0,051 ± 0,048	0,032 ± 0,011	0,055 ± 0,028
Sabineno	0,031 ± 0,023	0,040 ± 0,031	0,023 ± 0,006
β-Pineno	0,006 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,006 ± 0,003
β-Mirceno	0,172 ± 0,071	0,131 ± 0,041	0,130 ± 0,024
Octanal	0,024 ± 0,003	0,026 ± 0,019	0,028 ± 0,028
α-Felandreno	0,056 ± 0,048	0,022 ± 0,028	0,024 ± 0,027
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,011 ± 0,012	0,004 ± 0,002	0,003 ± 0,001
α-Terpineno	0,294 ± 0,188	0,187 ± 0,048	0,260 ± 0,102

<b>Limoneno</b>	12,313 ± 5,497	8,369 ± 1,808	8,814 ± 2,637
<b>γ-Terpineno</b>	0,123 ± 0,075	0,081 ± 0,020	0,110 ± 0,042
<b>Octanol</b>	0,047 ± 0,014	0,038 ± 0,007	0,063 ± 0,022
<b>Linalol</b>	0,103 ± 0,019	0,058 ± 0,029	0,173 ± 0,017
<b>Nonanal</b>	0,011 ± 0,009	0,004 ± 0,003	0,006 ± 0,005
<b>Citronelal</b>	0,003 ± 0,001	0,012 ± 0,020	0,002 ± 0,0007
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,084 ± 0,069	0,063 ± 0,024	0,077 ± 0,066
<b>α-Terpineol</b>	0,106 ± 0,096	0,146 ± 0,056	0,255 ± 0,294
<b>Decanal</b>	0,015 ± 0,011	0,015 ± 0,004	0,010 ± 0,007
<b>Acetato de Octilo</b>	0,001 ± 0,002	0,001 ± 0,0008	tr
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,341 ± 0,587	0,016 ± 0,011	0,025 ± 0,009
<b>Carveol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Neral</b>	0,006 ± 0,011	0,006 ± 0,008	N.D.
<b>Carvona</b>	0,166 ± 0,238	0,015 ± 0,012	0,014 ± 0,008
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,017 ± 0,028	0,003 ± 0,005	0,014 ± 0,004
<b>Geranial</b>	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,007 ± 0,005
<b>Perialdehido</b>	0,002 ± 0,004	0,001 ± 0,002	0,008 ± 0,006
<b>Undecanal</b>	0,001 ± 0	tr	tr
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,001
<b>Acet. nerilo</b>	0,004 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001
<b>Acet. geranilo</b>	0,002 ± 0,0007	0,014 ± 0,016	0,001 ± 0,001
<b>Dodecanal</b>	0,007 ± 0,005	0,010 ± 0,006	0,022 ± 0,025
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	0,012 ± 0,008	0,094 ± 0,105
<b>Cariofileno</b>	0,023 ± 0,026	0,006 ± 0,006	0,004 ± 0,005
<b>α-Humuleno</b>	0,001 ± 0,001	0,008 ± 0,009	0,003 ± 0,002
<b>Dodecanol</b>	0,008 ± 0,009	0,055 ± 0,058	0,010 ± 0,005
<b>Valenceno</b>	0,482 ± 0,394	0,832 ± 0,664	0,408 ± 0,304

Estudios realizados por Moshonas y Shaw en 1995 de los componentes volátiles en el espacio de cabeza dinámico del zumo de naranja exprimido a mano, ofrecen resultados coincidentes. Al igual que en nuestro caso, detectan cantidades de neral, geranial, octanal y decanal que oscilan entre 0,01 y 0,04 ppm. Estos componentes han sido considerados por Shaw (1991) como importantes contribuidores al aroma del zumo de naranja; sin embargo, concentraciones más elevadas de las detectadas no mejoran necesariamente el aroma fresco del zumo de naranja como aportan los autores arriba citados.

*Alcoholes.*- Destacamos la detección de componentes de elevada volatilidad, como etanol, 1-penten-3-ol, 3-metil-1-butanol y trans-2-hexen-1ol, no detectados anteriormente a causa de su elevada volatilidad y escasa afinidad hacia el hexano.

Etanol, 3-metil-1-butanol, linalol y  $\alpha$ -terpineol han sido encontrados en cantidades muy próximas que oscilan entre 0,4 y 0,1 ppm, pudiendo ser considerados como los alcoholes mayoritarios. 1-Heptanol, octanol, terpinen-4-ol, geraniol y dodecanol se determinan a bajas concentraciones, comprendidas entre 0,08 ppm en el caso del terpinen-4-ol y 0,008 ppm para el dodecanol.

Nisperos-Carriedo y Shaw en su trabajo de 1990 sobre el aroma en espacio de cabeza del zumo de naranja fresco exprimido a mano, valoran como componentes alcohólicos mayoritarios metanol y etanol, seguido de 3-hexen1-ol linalol y  $\alpha$ -terpineol, que son característicos del aceite esencial de la naranja y son determinados sólo a nivel de componentes traza.

En 1994 Moshonas y Shaw realizan un estudio similar con resultados muy próximos a los anteriormente descritos.

Las diferencias de resultados obtenidos por nosotros tendría su justificación en el hecho de que el zumo extraído a mano procede de naranjas completas, a las que no le han sido separadas las glándulas

oleíferas, que contienen el aceite esencial, mediante pelado de la totalidad del flavedo y gran parte del albedo, por lo que la introducción de aceite esencial del mismo resulta inevitable, haciendo aumentar el contenido de algunos componentes; Moshonas y Shaw (1994) refieren que se duplican algunos, como los compuestos terpénicos en general. Además también ha de considerarse el hecho de trabajar con métodos distintos, ya que estos autores utilizan el estudio de los componentes volátiles en espacio de cabeza dinámico, frente al sistema de equilibrio químico entre fases utilizado en este estudio.

*Hidrocarburos terpénicos.*- La extracción de terpenos mediante PDMS, según las características que definen a este recubrimiento polimérico, queda bastante favorecida con relación al resto de componentes analizados.

De los componentes estudiados resultan ser mayoritarios limoneno, valenceno,  $\alpha$ -terpineno y mirceno. En relación al resto de componentes todos ellos son detectados en concentraciones por debajo de 0,1 ppm.

Las cantidades determinadas por otros autores como Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), Moshonas y Shaw (1994 y 1995), superan en gran medida a las detectadas en nuestros análisis debido a los diferentes métodos de extracción.

*Esteres y Cetonas.*- Con relación a estos constituyentes, destacamos la presencia de acetona, metil-vinil-cetona, etil-vinil-cetona y carvona, no detectados en su totalidad mediante la técnica de recuperación de volátiles totales por SDE como consecuencia de su elevada volatilidad.

Así mismo resulta interesante resaltar la elevada concentración a la que es detectada la acetona. Este componente no ha sido analizado ampliamente por otros autores en el estudio de componentes volátiles en espacio de cabeza con muestras de zumo de naranja.

#### IV.3.2.1.2.- Extracción mediante PA

Un estudio paralelo de la composición de componentes volátiles en el espacio de cabeza del zumo de naranja exprimido a mano se ha realizado empleando fibra recubierta de poliacrilato.

Este recubrimiento se caracteriza por su especificidad hacia componentes de elevada polaridad y volatilidad, de tal forma que los resultados obtenidos cualitativamente deberían ser similares a los detectados mediante la extracción con polidimetilsiloxano, aunque el resultado del análisis cuantitativo no se reproduzca.

En este caso, los resultados de la extracción quedan reflejados en la Tabla IV.3.2.1.-2, que permite su confrontación con las determinaciones correspondiente a la fibra de PDMS (Tabla IV.3.2.1.-1).

El estudio comparado de los componentes retenidos en ambos recubrimientos poliméricos, nos lleva a destacar la ausencia de etanol y metil.vinil-cetona en la extracción con PA, frente a la detección de 1-butanol y dodecanol que no fueron detectados con PDMS.

*Aldehidos.*- En la mayoría de los casos son todos ellos valorados en concentraciones próximas en ambos recubrimientos poliméricos. Destacar el hecho del acetaldehído, únicamente detectado mediante PDMS en las muestras correspondientes al mes de abril, y decanal que resulta ser determinado en mayor concentración en la extracción con PA. Aldehidos como hexanal, trans-2-hexenal, octanal y neral son detectados en mayor proporción mediante PDMS.

*Alcoholes.*- Con excepción de etanol y 1-penten-3-ol, que no se determinan en la extracción con PA, el resto de los alcoholes considerados se extraen en concentraciones menores en relación a la determinación con PDMS.



*Hidrocarburos terpénicos.*- Dada su naturaleza de baja polaridad y volatilidad, deberían ser recuperados en mayor concentración mediante PDMS. Los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial de la naranja, caso de mirceno, limoneno,  $\Delta_3$ -careno, cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y valenceno, son detectados en concentraciones próximas en ambos recubrimientos poliméricos. El resto de componentes terpénicos, entre los que destacamos  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno y  $\alpha$  y  $\gamma$ -terpineno, son extraídos en mayor proporción con el recubrimiento apolar, como cabría esperar.

*Ésteres y Cetonas.*- Los ésteres de mayor volatilidad, como acetato de etilo y butirato de metilo, se detectan en menor concentración por la extracción con PA; de igual forma ocurre con las cetonas metil-vinil-cetona y etil-vinil-cetona. Todos estos componentes, según lo afirmado por numerosos autores entre los que destaca Arctander (1969), son considerados como los responsables del aroma frutal del zumo.

De todo ello, podemos concluir que la determinación de componentes volátiles en espacio de cabeza en el zumo fresco de la naranja queda favorecida con el empleo de PDMS como recubrimiento polimérico del sistema de SPME, frente al polímero PA de carácter polar.

Tabla. IV.3.2.1.-2.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO EXPRIMIDO A MANO. HS-SPME. (PA).**

Componentes (mg/Kg)	Naranja Exprimida		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	181,487± 42,206	239,793 ± 91,077	189,245 ± 84,690
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	0,535 ± 0,553	0,170 ± 0,341	0,498 ± 0,419
1-Butanol	0,203 ± 0,323	0,042 ± 0,084	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	0,337 ± 0,562	0,449 ± 0,529	0,194 ± 0,171
Valeraldehido+2 Pentanol	0,068 ± 0,119	0,149 ± 0,175	0,220 ± 0,204
Butirato de metilo	0,009 ± 0,016	0,028 ± 0,057	0,011 ± 0,018
3-metil-1-Butanol	0,170 ± 0,158	0,391 ± 0,532	0,476 ± 0,338
Hexanal+Butirato de etilo	0,754 ± 0,194	0,679 ± 0,501	0,269 ± 0,084
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,007 ± 0,012	0,026 ± 0,030	0,020 ± 0,019
Trans-2-Hexen 1-ol	0,028 ± 0,048	0,017 ± 0,030	0,044 ± 0,036
α-Pineno	0,06 ± 0,035	0,029 ± 0,008	0,042 ± 0,027
1-Heptanol	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,005	0,001 ± 0,001
Sabineno	0,008 ± 0,008	0,010 ± 0,009	0,013 ± 0,017
β-Pineno	0,002 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,004
β-Mirceno	0,179 ± 0,081	0,084 ± 0,018	0,123 ± 0,070
Octanal	0,019 ± 0,017	0,013 ± 0, 0069	0,002 ± 0,003
α-Felandreno	0,012 ± 0,006	0,006 ± 0,011	0,042 ± 0,027
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,012 ± 0,013	0,002 ± 0,002	0,001 ± 0,001
α-Terpineno	0,015 ± 0,008	0,011 ± 0,001	0,028 ± 0,013

<b>Limoneno</b>	11,612 ± 5,197	5,477 ± 1,192	8,166 ± 4,666
<b>γ-Terpineno</b>	0,010 ± 0,004	0,007 ± 0,0005	0,017 ± 0,010
<b>Octanol</b>	0,016 ± 0,009	0,007 ± 0,005	0,037 ± 0,012
<b>Linalol</b>	0,032 ± 0,001	0,019 ± 0,008	0,054 ± 0,005
<b>Nonanal</b>	0,017 ± 0,009	0,014 ± 0,007	0,013 ± 0,006
<b>Citronelal</b>	0,002 ± 0,001	0,001 ± 0,0004	0,001 ± 0,001
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,055 ± 0,034	0,026 ± 0,002	0,069 ± 0,038
<b>α-Terpineol</b>	0,048 ± 0,054	0,018 ± 0,002	0,131 ± 0,183
<b>Decanal</b>	0,032 ± 0,022	0,023 ± 0,003	0,021 ± 0,007
<b>Acetato de octilo</b>	0,003 ± 0,004	0,001 ± 0,0009	0,003 ± 0,002
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,005 ± 0,0005	0,003 ± 0,001	0,011 ± 0,0005
<b>Carveol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Neral</b>	0,003 ± 0,005	N.D.	N.D.
<b>Carvona</b>	0,044 ± 0,006	0,027 ± 0,011	0,024 ± 0,006
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,008 ± 0,001	0,014 ± 0,023	0,015 ± 0,003
<b>Geranial</b>	0,008 ± 0,011	N.D.	0,063 ± 0,102
<b>Perialdehido</b>	0,013 ± 0,006	0,002 ± 0,003	0,010 ± 0,008
<b>Undecanal</b>	0,044 ± 0,074	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,002
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,001 ± 0,002	N.D.	0,001 ± 0,0007
<b>Acet. nerilo</b>	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,0005
<b>Acet. geranilo</b>	0,002 ± 0,0005	0,0007 ± 0,001	0,001 ± 0,0004
<b>Dodecanal</b>	0,013 ± 0,012	0,009 ± 0,004	0,006 ± 0,002
<b>Antranilato de etilo</b>	0,006 ± 0,010	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,01 ± 0,006	0,009 ± 0,005	0,009 ± 0,002
<b>α-Humuleno</b>	0,002 ± 0,002	0,008 ± 0,007	0,002 ± 0,0005
<b>Dodecanol</b>	0,012 ± 0,017	0,023 ± 0,024	0,013 ± 0,007
<b>Valenceno</b>	0,598 ± 0,492	0,889 ± 0,804	0,424 ± 0,245

#### IV.3.2.2.- Zumo de naranja comercial

El análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza en zumo pasteurizado se ha llevado a cabo de igual forma que en el caso anterior, mediante la aplicación de los dos tipos de recubrimiento polimérico, PDMS y PA.

##### IV.3.2.2.1.- Extracción mediante PDMS

Los componentes detectados mediante el empleo de PDMS quedan especificados en la Tabla IV.3.2.2.-1.

Los resultados obtenidos muestran que a nivel cualitativo las diferencias existentes entre el zumo exprimido a mano y el zumo pasteurizado, son debidas a las pérdidas de los componentes de mayor volatilidad. La mayor parte de este descenso en la concentración de volátiles, tiene lugar durante las etapas del procesamiento industrial. Así, no son detectados etanol, metil-vinil-cetona y butirato de metilo, siendo este último considerado como un importante contribuidor al aroma fresco de la naranja. También hemos de destacar la detección de dos componentes oxigenados no identificados en el zumo de naranja exprimido a mano; estos son carveol y undecanal, que aparecen como componentes minoritarios en el aceite esencial de la naranja que tienen una volatilidad intermedia.

*Aldehidos.*- En el caso de aldehidos, el acetaldehido considerado por un gran número de autores como uno de los componentes mayoritarios en el zumo fresco de naranja, se detecta únicamente en las muestras correspondientes al mes de abril. Su contenido es bastante similar en ambos tipos de zumo y se encuentra a una concentración bastante pequeña, próxima a 0,02 ppm.

También hemos de resaltar las diferencias existentes entre los contenidos de valeraldehído, hexanal y trans-2-hexanal, este último no detectado en las muestras de zumo tratado en la industria.

Al contrario, el resto de aldehídos identificados, a excepción de neral y geranial, están presentes en cantidades superiores en el zumo de procedencia industrial como consecuencia de la incorporación de aceite esencial durante la etapa de exprimido del mismo.

Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), sobre compuestos volátiles del espacio de cabeza en zumo exprimido a mano y zumo pasteurizado, demuestran que en el caso de aldehídos el acetaldehído presente en el zumo pasteurizado es bastante inferior al detectado en zumo fresco. No obstante, en los casos de hexanal y octanal los resultados que determinan estos autores no coinciden con los encontrados en nuestro estudio, ya que la concentración de estos componentes en el zumo pasteurizado es superior a la detectada en el zumo fresco. Este resultado aboga por que las condiciones de pasteurización empleadas en estos zumos han sido más suaves que las aplicadas a los zumos que abordamos en nuestro estudio, lo cual supone una menor pérdida de componentes procedentes del aceite esencial incorporado al zumo durante el proceso de extracción.

*Alcoholes.*- Como se ha comentado anteriormente, etanol y trans-2-hexen-1-ol no son detectados en el zumo pasteurizado. El resto de alcoholes entre los que se incluyen 1-heptanol, octanol, linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, carveol, geraniol y dodecanol se determinan en niveles de concentraciones muy superiores, en ocasiones casi 10 veces mayores a las que se detectan en el zumo exprimido a mano.

Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), detectan metanol y etanol en ambas modalidades de zumo, destacando en ambos casos una disminución importante en el contenido en el zumo pasteurizado.

Tabla IV.3.2.2.-1.- COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA PASTEURIZADO. HS-SPME (PDMS).

Componentes (mg/Kg)	Zumó Pasteurizado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehído	N.D.	0,023 ± 0,040	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	21,800 ± 8,227	18,383 ± 9,005	33,022 ± 8,852
Metil-vinil-cetona	N.D.	0,933 ± 1,616	N.D.
Acetato de etilo	0,991 ± 1,401	1,500 ± 2,598	0,393 ± 0,555
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	1,353 ± 0,731	1,191 ± 1,881	1,147 ± 0,016
Valeraldehído+2 Pentanol	0,137 ± 0,055	0,258 ± 0,227	0,200 ± 0,028
Butirato de metilo	N.D.	N.D.	N.D.
3-metil-1-Butanol	N.D.	N.D.	0,120 ± 0,170
Hexanal+Butirato de etilo	0,041 ± 0,0003	0,086 ± 0,047	0,055 ± 0,012
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,005 ± 0,008	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	0,414 ± 0,091	0,583 ± 0,339	0,499 ± 0,065
1-Heptanol	0,129 ± 0,104	0,192 ± 0,113	0,251 ± 0,0007
Sabineno	0,053 ± 0,024	0,116 ± 0,042	0,070 ± 0,034
β-Pineno	0,052 ± 0,030	0,054 ± 0,011	0,080 ± 0,037
β-Mirceno	0,731 ± 0,197	0,979 ± 0,488	0,781 ± 0,081
Octanal	0,045 ± 0,051	0,206 ± 0,343	0,007 ± 0,004
α-Felandreno	0,239 ± 0,142	0,206 ± 0,189	0,301 ± 0,044
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,037 ± 0,031	0,030 ± 0,013	0,017 ± 0,001
α-Terpineno	1,062 ± 0,162	1,524 ± 0,393	1,216 ± 0,230

<b>Limoneno</b>	34,220 ± 6,632	33,554 ± 16,814	35,145 ± 2,961
<b>γ-Terpineno</b>	0,502 ± 0,073	0,707 ± 0,166	0,543 ± 0,127
<b>Octanol</b>	0,341 ± 0,053	0,420 ± 0,044	0,481 ± 0,001
<b>Linalol</b>	0,957 ± 0,140	1,091 ± 0,395	0,897 ± 0,193
<b>Nonanal</b>	0,021 ± 0,006	0,019 ± 0,007	0,015 ± 0,0007
<b>Citronelal</b>	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,002	0,004 ± 0
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,671 ± 0,126	0,648 ± 0,215	0,481 ± 0,075
<b>α-Terpineol</b>	0,845 ± 0,038	0,704 ± 0,492	1,005 ± 0,084
<b>Decanal</b>	0,085 ± 0,010	0,072 ± 0,063	0,083 ± 0,010
<b>Acetato de octilo</b>	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,019	0,004 ± 0,0008
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,105 ± 0,027	0,142 ± 0,044	0,151 ± 0,011
<b>Carveol</b>	0,013 ± 0,019	0,013 ± 0,023	0,039 ± 0,003
<b>Neral</b>	0,001 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,002 ± 0,0003
<b>Carvona</b>	0,047 ± 0,0045	0,075 ± 0,035	0,086 ± 0,002
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,098 ± 0,007	0,103 ± 0,026	0,153 ± 0,046
<b>Geranial</b>	0,017 ± 0,001	0,023 ± 0,011	0,052 ± 0,032
<b>Perialdehido</b>	0,015 ± 0,004	0,024 ± 0,004	0,030 ± 0,021
<b>Undecanal</b>	0,005 ± 0,0002	0,006 ± 0,002	0,005 ± 0,0007
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,003 ± 0,001	0,010 ± 0,002	0,011 ± 0,002
<b>Acet. nerilo</b>	0,008 ± 0,0004	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,0001
<b>Acet. geranilo</b>	0,014 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,002
<b>Dodecanal</b>	0,029 ± 0,0002	0,033 ± 0,009	0,018 ± 0,019
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	0,043 ± 0,068	0,191 ± 0,248
<b>Cariofileno</b>	0,091 ± 0,112	0,010 ± 0,006	0,012 ± 0,016
<b>α-Humuleno</b>	0,005 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,010 ± 0,001
<b>Dodecanol</b>	0,015 ± 0,005	0,031 ± 0,013	0,030 ± 0,039
<b>Valenceno</b>	0,281 ± 0,100	0,625 ± 0,291	1,442 ± 0,346

Trans-2-hexen-1ol identificado en el zumo fresco de igual forma que en nuestros resultados no se detecta en el zumo pasteurizado.

Linalol y  $\alpha$ -terpineol cuantificados a nivel de componentes traza por los mismos autores en el zumo fresco, no los detectan en el zumo pasteurizado. Estos resultados contrastan con los aquí determinados ya que, como se ha comentado anteriormente, se determinan a concentraciones casi 10 veces superiores en el zumo pasteurizado.

*Hidrocarburos terpénicos.*- No presentan diferencias cualitativas entre ambos zumos, aunque si han de destacarse las diferencias a nivel cuantitativo entre los componentes mayoritarios.  $\beta$ -mirceno y limoneno duplican su concentración en el zumo de procedencia industrial. El valenceno también es considerado como un componente sesquiterpénico bastante abundante en la piel de la naranja. Sin embargo no se detectan diferencias en el contenido entre ambas modalidades de zumo. Esto se debe a la importancia de los coeficientes de reparto de los componentes entre las fases que conforman el sistema de recuperación. El valenceno es un componente de baja volatilidad y elevado peso molecular; la difusión del mismo a través de la fase acuosa es bastante lenta, por lo que esto es lo que determina su escasa adsorción a nivel de la fibra.

Autores como Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), encuentran un disminución de la concentración de sabineno y valenceno por efecto de la pasteurización, lo que no sucede con  $\alpha$ -pineno y limoneno.

*Ésteres y Cetonas.*- Son detectados en menor concentración, tal es el caso de acetona y etil-vinil-cetona. Metil-vinil-cetona y butirato de metilo no son encontrados, aumentando ligeramente su concentración acetato de octilo, nerilo y geranilo junto con antranilato de etilo.

El contenido en ésteres detectado por Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), no es coincidente con nuestros resultados, pues butirato de metilo no modifica su concentración tras la pasteurización.



#### IV.3.2.2.2.- Extracción mediante PA

El análisis del espacio de cabeza en zumo de naranja pasteurizado mediante el recubrimiento de PA muestra resultados similares a los encontrados en el estudio con PDMS. Estos datos quedan recogidos en la Tabla IV.3.2.2.-3.

El análisis de los componentes volátiles en espacio de cabeza de zumo pasteurizado no presenta diferencias importantes a nivel cualitativo con el estudiado sobre el zumo de naranja exprimido a mano.

Agrupando los componentes de igual grupo funcional se comentan a continuación los resultados determinados.

*Aldehídos.*- Destacamos que no se detecta acetaldehído en ninguno de los dos zumos analizados mediante PA.

Valeraldehído no presenta modificaciones importantes de contenido en zumo fresco y zumo pasteurizado y el mismo comportamiento se observa en el trans-2-hexenal. Estos resultados no coinciden con los anteriormente expuestos para PDMS, donde se ha detallado que los contenidos en valeraldehído y trans-2-hexenal disminuyen en gran medida en el zumo pasteurizado.

Hexanal reduce su concentración a la décima parte. El resto de aldehídos presentan una concentración más elevada en el zumo pasteurizado como consecuencia de la incorporación de aceite esencial de la corteza en las máquinas extractoras.

Tabla IV.3.2.2.-3.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA PASTEURIZADO HS-SPME. EMPLEO DE PA.**

Componentes (mg/kg)	Zumó Pasteurizado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehído	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	3,225 ± 4,561	2,367 ± 4,099	N.D.
Acetona	138,086 ± 32,835	195,713 ± 85,080	179,212 ± 36,529
Metil-vinil-cetona	1,982 ± 2,803	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	0,197 ± 0,278
1-Butanol	0,212 ± 0,300	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	1,004 ± 0,238	0,456 ± 0,609	0,047 ± 0,066
Valeraldehído+2 Pentanol	N.D.	0,163 ± 0,173	0,395 ± 0,3005
Butirato de metilo	N.D.	N.D.	N.D.
3-metil-1-Butanol	N.D.	0,317 ± 0,122	0,327 ± 0,088
Hexanal+Butirato de etilo	0,055 ± 0,017	0,082 ± 0,033	0,089 ± 0,041
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,028 ± 0,001	0,062 ± 0,046	0,185 ± 0,137
Trans-2-Hexen 1-ol	0,087 ± 0,057	0,154 ± 0,071	0,298 ± 0,197
α-Pineno	0,327 ± 0,127	0,277 ± 0,057	0,278 ± 0,022
1-Heptanol	0,008 ± 0,002	0,006 ± 0,002	0,009 ± 0,005
Sabineno	0,045 ± 0,057	0,044 ± 0,005	0,021 ± 0,013
β-Pineno	0,074 ± 0,011	0,057 ± 0,012	0,065 ± 0,026
β-Mirceno	0,864 ± 0,344	0,780 ± 0,161	0,683 ± 0,051
Octanal	0,052 ± 0,041	0,029 ± 0,012	0,022 ± 0,001
α-Felandreno	0,119 ± 0,141	0,161 ± 0,041	0,188 ± 0,007
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,093 ± 0,002	0,045 ± 0,015	0,051 ± 0,004
α-Terpineno	0,109 ± 0,058	0,114 ± 0,016	0,131 ± 0,002

<b>Limoneno</b>	37,430 ± 10,793	36,384 ± 4,442	32,405 ± 1,426
<b>γ-Terpineno</b>	0,097 ± 0,027	0,099 ± 0,018	0,091 ± 0,004
<b>Octanol</b>	0,218 ± 0,041	0,264 ± 0,025	0,345 ± 0,047
<b>Linalol</b>	0,322 ± 0,013	0,435 ± 0,163	0,307 ± 0,089
<b>Nonanal</b>	0,036 ± 0,001	0,042 ± 0,013	0,032 ± 0,003
<b>Citronelal</b>	0,003 ± 0	0,005 ± 0,001	0,003 ± 0,0005
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,490 ± 0,110	0,525 ± 0,151	0,354 ± 0,091
<b>α-Terpineol</b>	0,446 ± 0,034	0,558 ± 0,063	0,496 ± 0,006
<b>Decanal</b>	0,161 ± 0,009	0,177 ± 0,057	0,162 ± 0,005
<b>Acetato de octilo</b>	0,008 ± 0,001	0,011 ± 0,003	0,01 ± 0,002
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,059 ± 0,009	0,081 ± 0,024	0,097 ± 0,113
<b>Carveol</b>	0,238 ± 0,237	0,052 ± 0,062	0,085 ± 0,003
<b>Neral</b>	0,002 ± 0,0001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,0002
<b>Carvona</b>	0,083 ± 0,019	0,095 ± 0,042	0,112 ± 0,008
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,101 ± 0,017	0,095 ± 0,012	0,103 ± 0,012
<b>Geranial</b>	0,029 ± 0,004	0,027 ± 0,003	0,046 ± 0,001
<b>Perialdehido</b>	0,039 ± 0,006	0,044 ± 0,029	0,038 ± 0,005
<b>Undecanal</b>	0,009 ± 0,001	0,006 ± 0,006	0,009 ± 0,001
<b>Acet. Terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,004 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001
<b>Acet. nerilo</b>	0,007 ± 0,0004	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,0005
<b>Acet. geranilo</b>	0,011 ± 0,003	0,009 ± 0,001	0,006 ± 0,0004
<b>Dodecanal</b>	0,040 ± 0,0004	0,039 ± 0,008	0,033 ± 0,008
<b>Antranilato de etilo</b>	0,009 ± 0,012	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,014 ± 0,002	0,018 ± 0,004	0,019 ± 0,001
<b>α-Humuleno</b>	0,007 ± 0,0003	0,009 ± 0,001	0,011 ± 0,001
<b>Dodecanol</b>	0,014 ± 0,0008	0,022 ± 0,011	0,043 ± 0,001
<b>Valenceno</b>	0,422 ± 0,051	0,740 ± 0,357	1,428 ± 0,035

*Alcoholes.*- Etanol y carveol son detectados únicamente mediante PA en el zumo pasteurizado. Este dato es inverso al encontrado en la extracción con PDMS, donde el etanol únicamente es detectado en el zumo de naranja exprimido a mano. Esto explica la importancia de la naturaleza del recubrimiento polimérico en la extracción mediante SPME.

Las interacciones entre componentes, así como las afinidades de los mismos hacia el recubrimiento determinan la mayor o menor adsorción de cada uno de ellos en la fibra.

Un grupo de alcoholes, 1-butanol, 3-metil-1-butanol y dodecanol destacan por presentar un comportamiento próximo de adsorción en ambos tipos de zumo.

El resto de componentes de naturaleza alcohólica se determinan en mayor concentración en el zumo pasteurizado.

*Hidrocarburos Terpénicos.*- Los componentes terpénicos en el espacio de cabeza del zumo pasteurizado aumentan su concentración con relación al zumo exprimido a mano salvo la excepción de valenceno, ya que este componente es detectado prácticamente al mismo nivel de concentración en ambos tipos de zumo.

*Ésteres y cetonas.*- El comportamiento de extracción de estos componentes mediante PA en el zumo pasteurizado difiere del detectado mediante PDMS. Tal es el caso de acetato de etilo y butirato de metilo, componentes no detectados en el zumo de naranja pasteurizado. El resto de ésteres estudiados aumentan su concentración en relación al zumo de naranja exprimido a mano, a excepción de antranilato de etilo para el que no se encuentran diferencias en ambas variedades de zumo.

En relación a las cetonas, la acetona no presenta modificaciones en la cantidad adsorbida mediante PA. Metil-vinil-cetona se detecta únicamente en el zumo pasteurizado de las muestras correspondientes al mes de enero. El resto de cetonas aumentan su concentración en el zumo pasteurizado.

#### IV.3.2.3.- *Análisis estadístico*

Mediante el estudio estadístico de los datos obtenidos en la extracción, empleando el análisis de varianza simple (test de homogeneidad de medias de Scheefe,  $p < 0,05$ ), se determinan las diferencias estadísticamente significativas entre los datos de las concentraciones medias en espacio de cabeza del zumo exprimido a mano y el zumo pasteurizado, así como las diferencias debidas a la aplicación de las dos fibras, PDMS y PA, en la valoración de componentes volátiles en los dos tipos de zumo considerados.

##### IV.3.2.3.1.- *Extracción mediante PDMS*

La Tabla IV.3.2.3.-1, refleja las diferencias significativas existentes entre el contenido en componentes volátiles agrupados en base a su naturaleza química del zumo de naranja exprimido a mano y el zumo pasteurizado.

Se determinan diferencias significativas importantes en el contenido en aldehídos, alcoholes y terpenos, que no se encuentran entre ésteres y cetonas. Estos resultados comienzan a esbozar la importancia del procesado industrial sobre la composición aromática del zumo de naranja. En el zumo exprimido a mano la composición en aldehídos y cetonas supera en gran medida a la detectada en el zumo

pasteurizado, frente a la mayor concentración de hidrocarburos y alcoholes terpénicos en los zumos de procedencia industrial.

**Tabla IV.3.2.3.-1. ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO EXPRIMIDO A MANO- ZUMO PASTEURIZADO EN PDMS.**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>ZUMO EXP</b>	1,25 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,10 <sup>a</sup>	10,76 ± 3,70 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,49 <sup>a</sup>	41,18 ± 22,08 <sup>a</sup>
<b>ZUMO PAST.</b>	0,58 ± 0,38 <sup>b</sup>	3,37 ± 0,25 <sup>b</sup>	37,83 ± 12,39 <sup>b</sup>	1,14 ± 1,65 <sup>a</sup>	25,24 ± 9,74 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con índices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

#### IV.3.2.3.2. -Extracción mediante PA

A nivel cuantitativo, el análisis de varianza simple entre los resultados obtenidos para ambos tipos de zumo, muestra que únicamente existen diferencias en el contenido de alcoholes y terpenos. según los resultados reflejados en la Tabla IV.3.2.3.-2.

**Tabla IV.3.2.3.-2.- ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO EXPRIMIDO A MANO- ZUMO PASTEURIZADO EN PA.**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>ZUMO EXP</b>	0,84 ± 0,43 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,46 <sup>a</sup>	9,04 ± 4,47 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,43 <sup>a</sup>	264,20 ± 128,20 <sup>a</sup>
<b>ZUMO PAST</b>	0,71 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,67 ± 3,04 <sup>b</sup>	38,02 ± 5,89 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,13 <sup>a</sup>	226,90 ± 110,40 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con índices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Si se compara la composición aromática determinada en ambos tipos de zumo, en el caso de la extracción con PDMS se encuentran diferencias significativas en los contenidos de aldehídos, alcoholes y terpenos frente a los resultados obtenidos con el empleo de PA, donde únicamente se observan diferencias en el contenido de alcoholes y terpenos. De aquí deriva la importancia del empleo de un tipo de fibra u otro dependiendo de la composición y naturaleza de la muestra a estudiar.

Para poder interpretar mejor este hecho pasamos a realizar un análisis estadístico de los resultados determinados con los dos recubrimientos poliméricos de la fibra sobre un mismo substrato, ya sea zumo fresco o pasteurizado.

Los resultados relativos al zumo exprimido en el laboratorio se expresan en la Tabla IV.3.2.3.-3.

Tabla IV.3.2.3.-3.- **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE EN ZUMO EXPRIMIDO A MANO. PA-PDMS**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H. TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>PA</b>	0,84 ± 0,42 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,46 <sup>a</sup>	9,04 ± 4,47 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,43 <sup>a</sup>	264,20 ± 128,20 <sup>a</sup>
<b>PDMS</b>	1,25 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,71 <sup>b</sup>	10,76 ± 3,70 <sup>a</sup>	0,89 ± 0,49 <sup>b</sup>	41,18 ± 22,08 <sup>b</sup>

Los valores de las medias con índices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Los resultados obtenidos muestran que salvo en los casos de aldehidos y terpenos, existen diferencias significativas entre las concentraciones del resto de los componentes del aroma en el espacio de cabeza del zumo exprimido a mano. Esto sólo tiene una explicación

en base a los diferentes coeficientes de reparto entre los componentes y el recubrimiento de la fibra.

Considerando el tiempo de exposición de cada recubrimiento polimérico en el espacio de cabeza de las muestras y el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, podemos deducir que en el caso de los aldehídos, al ser estos componentes de elevadas volatilidad y polaridad la afinidad hacia el PA es mayor que hacia el PDMS, por lo que el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio químico es mayor en el caso de PA. Esto explica la menor adsorción de estos componentes, que no son estadísticamente diferentes como consecuencia de que en el PDMS al tiempo de exposición determinado ha sido alcanzado su tiempo de equilibrio. Si la fibra de PA se mantuviese más tiempo de exposición en el espacio de cabeza, probablemente la adsorción a nivel cuantitativo sería más elevada y podrían apreciarse diferencias significativas.

Un caso similar ocurre con los terpenos debido a su baja polaridad y pequeña o media volatilidad. La afinidad de estos componentes hacia el PDMS es bastante más elevada.

El zumo de naranja exprimido a mano se caracteriza por presentar una escasa concentración en componentes terpénicos. Dadas las características químicas que definen a estos componentes, su presencia en el espacio de cabeza del zumo de naranja es mínima, por lo que pequeñas cantidades de estos componentes serán retenidas. Esto explica que en los tiempos de exposición determinados, existan pequeñas diferencias en las cantidades totales adsorbidas por ambos recubrimientos poliméricos de SPME.

Otro hecho a destacar es la mayor capacidad de adsorción de cetonas por parte del polímero PA. Esto es debido al amplio margen de detección de la acetona adsorbida por este recubrimiento.



En relación al zumo de naranja pasteurizado a nivel cuantitativo las diferencias existentes en las extracciones con ambos recubrimientos poliméricos quedan recogidas en la tabla IV.3.2.3.-4.

Tabla IV.3.2.3.-4.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE EN ZUMO PASTEURIZADO. PA-PDMS**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLE S	H. TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>PA</b>	0,71 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,67 ± 3,04 <sup>a</sup>	38,02 ± 5,88 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,14 <sup>a</sup>	226,90 ± 110,40 <sup>a</sup>
<b>PDMS</b>	0,58 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,37 ± 0,25 <sup>a</sup>	37,83 ± 12,39 <sup>a</sup>	1,14 ± 1,65 <sup>a</sup>	25,24 ± 9,74 <sup>b</sup>

Los valores de las medias con índices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Estadísticamente se observa que prácticamente no existen diferencias significativas entre la determinación de compuestos volátiles en espacio de cabeza mediante ambos recubrimientos poliméricos. Únicamente destacamos el hecho de las diferencias encontradas en el contenido en cetonas. Observando las Tablas IV.3.2.2.-1 y IV.3.2.2.-2. de resultados en las que quedan especificadas las concentraciones de todos los componentes, puede verse que esta diferencia se debe única y exclusivamente a la elevada concentración de acetona detectada mediante PA, que llega a superar el contenido en hidrocarburos terpénicos totales; la interacción entre la acetona y el PA justifica este hecho. Las diversas relaciones entre las cantidades de componente presente en la muestra, retenido y detectado o adsorbido, conlleva hacia resultados anormales, no coincidentes con la realidad, ya que no puede existir una concentración de acetona superior a la de limoneno en zumo de naranja. Esto conduce hacia la conclusión de que

el PA no es un polímero apto para la detección y cuantificación de la acetona.

También puede concluirse que -en caso de que las muestras a analizar tengan un contenido elevado de los componentes más volátiles, como sucede con el zumo de naranja exprimido a mano-, dadas las diferencias significativas existentes entre ambos tipos de recubrimiento, la extracción de volátiles queda favorecida con el empleo de PDMS.

En el caso de muestras con alto contenido en componentes de menor volatilidad, estadísticamente no son detectadas diferencias significativas en cuanto a la composición cuantitativa, pero si que se detecta en cuanto a la cualitativa, siendo de nuevo más adecuado la aplicación de PDMS.

Como conclusión general destacamos que la dinámica de adsorción de los componentes en ambas fibras es distinta dependiendo de la naturaleza de los mismos. En base a todo esto, se resalta que con PDMS el comportamiento global es más homogéneo, la mayoría de los componentes alcanzan su punto de equilibrio a los 45 minutos de exposición, frente a la variabilidad detectada con PA. Por lo tanto para estos tipos de zumo, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, resulta más adecuada la utilización de fibras recubiertas con PDMS que con PA.

El conjunto de estos resultados coinciden con los expresados por Boy-Boland *et al.* (1994), quienes deducen la efectividad del PDMS en la detección de componentes de naturaleza polar y apolar en el análisis de contaminantes medioambientales.

Considerando los resultados obtenidos en el caso de componentes volátiles totales (SDE) y en espacio de cabeza mediante PDMS y PA, deducimos la importancia del método de análisis en el estudio de los constituyentes volátiles como consecuencia de las diferentes afinidades de los mismos ya sea hacia el agente extractante

en la técnica de SDE o como la naturaleza del recubrimiento polimérico empleado en HS-SPME.

#### **IV.4.- EFECTO DEL PROCESADO INDUSTRIAL SOBRE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DEL ZUMO.**

El aroma está reconocido como uno de los atributos de calidad más importantes de los zumos cítricos. Sin aroma un zumo de naranja no es más que una solución azucarada, acidulada,...

El zumo de naranja es uno de los de mayor consumo mundial y un factor importante que condiciona este hecho es la calidad de su fracción aromática (Shaw, 1994).

El aroma fresco del zumo de naranja puede ser fácilmente modificado por los tratamientos a los que queda sometido durante su procesado industrial. Por este motivo es importante conocer los cambios sufridos por el mismo durante las distintas etapas del procesado, aplicando en base a esto posibles modificaciones que mejoren en gran medida la calidad de los productos acabados.

En este apartado estudiamos la influencia de las distintas etapas sobre la composición de la fracción aromática total y en espacio de cabeza de zumo de naranja, realizando para ello un estudio comparado entre etapas sucesivas del procesado, centrifugación, desaireación y pasteurización.

#### IV.4.1.- Efecto de la centrifugación. Separación de pulpa fina.

Teniendo en cuenta el esquema de producción de zumo de naranja industrial esquematizado en la Figura 1.2., una vez que el zumo ha sido extraído, este se somete a un proceso de clarificación con la consiguiente eliminación de pulpa, pequeños fragmentos de corteza, semillas, etc...

La clarificación del zumo se efectúa a través de una centrífuga decantadora de discos. En este tipo de máquina el contenido final de pulpa del orden del 1-3% en el zumo puede ser fácilmente ajustado según los requerimientos del mercado.

En base a esto, planteamos a continuación el estudio del efecto de la eliminación de la pulpa fina sobre el contenido en volátiles totales y en espacio de cabeza en el zumo de naranja refinado.

##### IV.4.1.1.- Componentes volátiles. SDE

Actualmente los zumos de naranja de procedencia industrial se caracterizan por presentar un contenido en pulpa comprendido entre un amplio margen de porcentaje -3 y 15%-, dependiendo de los requerimientos del mercado.

La eliminación de la pulpa afecta en gran medida al contenido en la fracción aromática del zumo como consecuencia del reparto existente de componentes volátiles entre la pulpa y el suero de un zumo (Radford *et al.* 1974).

El estudio comparado del contenido en componentes volátiles en el zumo refinado (10-15% S.I.) -después de exprimir y pasar a través del finisher- y el zumo centrifugado con un contenido en pulpa inferior al 3%, puede ser representativo del efecto de la eliminación de la pulpa sobre la calidad aromática del mismo.

Los resultados obtenidos mediante SDE en ambas modalidades de zumo quedan representados en las tablas IV.4.1.1.-1 y IV.4.1.1.-2.

Al igual que en el estudio de los volátiles totales en zumo de naranja exprimido a mano y el zumo pasteurizado, la extracción-distilación simultánea no nos permite la detección de componentes de elevada volatilidad.

*Aldehídos.*- Estudios realizados por Radford *et al.*, (1974), muestran la existencia de un reparto de componentes volátiles entre la pulpa y el suero del zumo, destacando la mayor afinidad de los componentes oxigenados hacia el suero y de los hidrocarburos hacia la pulpa. Además una separación de pulpa favorece la identificación de componentes oxigenados como consecuencia de la eliminación de la barrera que supone la pulpa en la extracción de componentes volátiles mediante SDE (Shaw y Wilson, 1980).

El estudio comparado del contenido en componentes volátiles entre estas dos modalidades de zumo muestra que la reducción del contenido en pulpa supone un aumento en la identificación de los aldehídos de mayor volatilidad; así octanal, nonanal y neral son detectados en concentraciones más elevadas observándose un aumento próximo al 50%, frente al comportamiento de los aldehídos de menor volatilidad, como perialdehído, undecanal y dodecanal que no quedan afectados por la eliminación de la pulpa fina del zumo refinado.

*Alcoholes.*- A nivel cualitativo no se detectan diferencias en los alcoholes detectados en ambos casos, únicamente podría resaltarse la no detección del dodecanol en el zumo sin pulpa, pero esto no puede ser considerado como significativo, ya que este componente sólo ha sido detectado en las muestras correspondientes al mes de enero en el zumo refinado.

Tabla IV.4.1.1.-1.- COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN ZUMO DE NARANJA REFINADO (10-13% S.I.)

Componentes (mg/Kg)	Zumó Refinado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehído	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	2,712 ± 1,529	1,069 ± 0,846	N.D.
Valeraldehído+2 Pentanol	1,621 ± 1,195	0,934 ± 0,738	N.D.
Butirato de metilo	0,413 ± 0,511	0,024 ± 0,059	N.D.
3-metil-1-Butanol	0,280 ± 0,444	0,076 ± 0,119	N.D.
Hexanal+Butirato de etilo	0,439 ± 0,363	0,521 ± 0,317	0,444 ± 0,072
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	1,895 ± 2,571	2,707 ± 1,086	3,074 ± 0,917
1-Heptanol	0,036 ± 0,072	0,023 ± 0,029	N.D.
Sabineno	1,025 ± 1,001	1,508 ± 1,132	1,629 ± 0,548
β-Pineno	0,473 ± 0,726	0,360 ± 0,167	0,303 ± 0,092
Mirceno	10,047 ± 10,218	11,253 ± 4,608	13,338 ± 3,972
Octanal	2,276 ± 3,616	0,694 ± 0,827	2,551 ± 2,655
α-Felandreno	0,131 ± 0,158	0,135 ± 0,142	0,063 ± 0,110
Δ <sub>3</sub> -Careno	1,522 ± 2,268	0,543 ± 0,367	0,594 ± 0,252
α-Terpineno	0,413 ± 0,535	0,349 ± 0,190	0,265 ± 0,076

<b>Limoneno</b>	624,84 ± 355,07	677,34 ± 281,77	962,73 ± 477,09
<b>γ-Terpineno</b>	0,883 ± 1,209	0,696 ± 0,318	0,576 ± 0,059
<b>Octanol</b>	3,740 ± 2,764	3,680 ± 1,638	4,504 ± 2,014
<b>Linalol</b>	5,878 ± 4,183	6,815 ± 3,585	10,00 ± 1,976
<b>Nonanal</b>	0,450 ± 0,576	0,286 ± 0,189	0,371 ± 0,332
<b>Citronelal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	3,162 ± 2,720	2,875 ± 1,410	2,703 ± 0,733
<b>α-Terpineol</b>	2,349 ± 1,104	4,027 ± 2,534	3,036 ± 1,229
<b>Decanal</b>	2,556 ± 3,388	2,273 ± 1,093	2,798 ± 1,174
<b>Acetato de octilo</b>	0,059 ± 0,081	0,186 ± 0,082	0,125 ± 0,116
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,471 ± 0,167	0,487 ± 0,138	0,605 ± 0,318
<b>Carveol</b>	N.D.	N.D.	0,032 ± 0,056
<b>Neral</b>	0,381 ± 0,576	0,187 ± 0,128	0,171 ± 0,156
<b>Carvona</b>	0,178 ± 0,275	0,172 ± 0,092	0,263 ± 0,078
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	1,063 ± 1,788	0,400 ± 0,147	0,428 ± 0,273
<b>Geranial</b>	0,687 ± 1,062	0,805 ± 0,381	0,951 ± 0,379
<b>Perialdehido</b>	0,082 ± 0,133	0,044 ± 0,049	0,167 ± 0,152
<b>Undecanal</b>	0,075 ± 0,150	0,043 ± 0,061	0,130 ± 0,020
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,025 ± 0,050	0,062 ± 0,122	0,060 ± 0,053
<b>Acet. nerilo</b>	0,047 ± 0,054	0,133 ± 0,101	0,197 ± 0,106
<b>Acet. geranilo</b>	0,172 ± 0,273	0,113 ± 0,091	0,093 ± 0,006
<b>Dodecanal</b>	0,280 ± 0,553	0,259 ± 0,152	0,310 ± 0,096
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,080 ± 0,134	0,109 ± 0,059	0,107 ± 0,062
<b>α-Humuleno</b>	0,040 ± 0,080	0,044 ± 0,045	0,033 ± 0,029
<b>Dodecanol</b>	0,012 ± 0,025	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	2,512 ± 3,381	2,937 ± 2,930	3,720 ± 4,232

Tabla IV.4.1.1.-2. COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN ZUMO DE NARANJA CENTRIFUGADO (<3%.S.I.)

Componentes (mg/Kg)	Zumoz (<3% S.I.)		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	tr
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	2,903 ± 1,490	0,369 ± 0,572	N.D.
Valeraldehido+2 Pentanol	1,453 ± 0,960	0,322 ± 0,499	N.D.
Butirato de metilo	0,180 ± 0,160	0,012 ± 0,031	N.D.
3-metil-1-Butanol	N.D.	0,075 ± 0,119	0,109
Hexanal+Butirato de etilo	0,666 ± 0,361	0,541 ± 0,134	0,540 ± 0,288
Furfural	N.D.	N.D.	0,041 ± 0,072
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	2,700 ± 3,267	1,172 ± 0,396	1,342 ± 0,528
1-Heptanol	0,046 ± 0,080	0,011 ± 0,017	0,007 ± 0,012
Sabineno	1,018 ± 1,364	0,475 ± 0,247	0,503 ± 0,402
β-Pineno	0,373 ± 0,646	0,238333333	0,114 ± 0,024
β-Mirceno	13,340 ± 17,165	4,672 ± 2,583	5,874 ± 2,479
Octanal	5,510 ± 5,009	2,553 ± 1,352	3,952 ± 1,411
α-Felandreno	0,123 ± 0,213	N.D.	N.D.
Δ <sub>3</sub> -Careno	1,943 ± 2,884	0,215 ± 0,059	0,234 ± 0,106
α-Terpineno	0,564 ± 0,768	0,214 ± 0,063	0,134 ± 0,035



<b>Limoneno</b>	789,0 ± 106,87	332,073 ± 70,88	364,276 ± 162,050
<b>γ-Terpineno</b>	1,108 ± 1,445	0,512 ± 0,186	0,313 ± 0,102
<b>Octanol</b>	1,791 ± 1,601	3,268 ± 2,787	0,862 ± 0,511
<b>Linalol</b>	7,270 ± 4,832	6,264 ± 1,938	7,838 ± 3,443
<b>Nonanal</b>	0,797 ± 0,737	0,403 ± 0,152	0,476 ± 0,208
<b>Citronelal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	3,741 ± 3,572	2,224 ± 0,586	2,040 ± 1,113
<b>α-Terpineol</b>	1,356 ± 1,465	1,096 ± 0,494	1,464 ± 0,618
<b>Decanal</b>	2,574 ± 2,734	1,715 ± 0,589	1,975 ± 0,299
<b>Acetato de octilo</b>	0,103 ± 0,178	0,021 ± 0,035	0,027 ± 0,047
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,298 ± 0,469	0,194 ± 0,021	0,170 ± 0,056
<b>Carveol</b>	0,027 ± 0,047	0,021 ± 0,053	N.D.
<b>Neral</b>	0,770 ± 0,903	0,243 ± 0,043	0,199 ± 0,086
<b>Carvona</b>	0,106 ± 0,184	0,141 ± 0,052	0,187 ± 0,110
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,312 ± 0,255	0,142 ± 0,070	0,142 ± 0,040
<b>Geranial</b>	1,074 ± 1,435	0,456 ± 0,128	0,311 ± 0,279
<b>Perialdehido</b>	0,1403 ± 0,192	0,105 ± 0,086	0,257 ± 0,161
<b>Undecanal</b>	0,181 ± 0,222	0,084 ± 0,097	0,033 ± 0,040
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,046 ± 0,080	0,106 ± 0,092	0,241 ± 0,363
<b>Acet. nerilo</b>	0,329 ± 0,411	0,178 ± 0,177	0,094 ± 0,059
<b>Acet. geranilo</b>	0,156 ± 0,254	0,050 ± 0,043	0,058 ± 0,101
<b>Dodecanal</b>	0,652 ± 0,994	0,113 ± 0,035	0,065 ± 0,072
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,1406 ± 0,224	0,043 ± 0,012	0,074 ± 0,035
<b>α-Humuleno</b>	0,075 ± 0,106	0,010 ± 0,017	0,042 ± 0,061
<b>Dodecanol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	2,890 ± 4,688	0,635 ± 0,172	1,466 ± 1,698

A nivel cuantitativo se observa un comportamiento generalizado de la disminución del contenido en alcoholes con la reducción de la pulpa. Estas pérdidas superan el 50% en la mayoría de los componentes estudiados. La excepción se encuentra en linalol y carveol -componentes que han sido detectados en mayor concentración-, destacando el hecho de que el carveol en el zumo refinado únicamente se detecta en algunas de las muestras correspondientes al mes de mayo, mientras que está presente en las muestras de los meses de enero y abril que producen zumos con menores contenidos en pulpa y en la que destaca un aumento muy significativo de su concentración. Sin embargo, estos resultados contrastan con los datos aportados por Radford *et al.*, (1974), que determinan que componentes oxigenados como los alcoholes no modifican su contenido en el zumo tras la eliminación de la pulpa.

*Hidrocarburos terpénicos.*- Estos hidrocarburos -considerados como los componentes mayoritarios en el aceite esencial de la naranja-, dada su naturaleza de baja polaridad, se encuentran asociados a la pulpa por lo que una disminución del porcentaje de la misma conlleva una pérdida de estos componentes en el aroma del zumo.

En efecto destacamos una pérdida comprendida entre el 30 y el 50% de concentración de los terpenos más abundantes en el zumo de naranja. Así sucede con  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, limoneno y valenceno. El resto de los terpenos identificados presentan una disminución próxima al 10%, con excepción del  $\alpha$ -felandreno, componente que no es detectado tras la eliminación de la pulpa.

*Ésteres y Cetonas.*- Presentes en menor cantidad en el zumo de naranja, la comparación de ambos resultados denota una disminución del contenido en estos constituyentes, dada su baja polaridad asociada a una mayor afinidad hacia la pulpa.

De las cetonas detectadas en ambas muestras etil-vinil-cetona es la de mayor polaridad, no detectándose diferencias en cuanto a su contenido en el zumo de naranja sin pulpa frente a carvona, componente de menor polaridad en el que si se detecta una disminución de su contenido al eliminar la pulpa del zumo.

#### IV.4.1.2.- Análisis estadístico

El efecto real de la eliminación de la pulpa sobre la fracción aromática total del zumo refinado se analiza mediante test de varianza simple (test de homogeneidad de medias de Scheefe,  $p < 0,05$ ), entre los contenidos medios de aldehídos, alcoholes, terpenos, ésteres y cetonas cuantificados en ambos zumos. Los valores estadísticos quedan reflejados en la Tabla IV.4.1.2.-1.

Tabla IV.4.1.2.-1.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO (10-15% S.I.)-ZUMO CENTRIFUGADO (<3% S.I.).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>10-15% S.I.</b>	7,33 ± 5,41 <sup>a</sup>	18,63 ± 8,24 <sup>a</sup>	747,90 ± 456,20 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,54 <sup>a</sup>	1,52 ± 1,46 <sup>a</sup>
<b>&lt;3% S.I.</b>	8,52 ± 6,10 <sup>a</sup>	12,61 ± 6,61 <sup>a</sup>	307,50 ± 113,50 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,11 ± 1,48 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Los resultados obtenidos reflejan que únicamente existen diferencias significativas en el contenido de terpenos. En efecto se conoce que estos componentes se encuentran prácticamente asociados a la pulpa (Radford *et al.*, 1974).

Como conclusión global destacamos el efecto de la disminución de la pulpa sobre el contenido en componentes de polaridad baja y media, caso de alcoholes, ésteres y cetonas, y como hemos mencionado, el grupo más representativo los hidrocarburos terpénicos. Únicamente los aldehídos aumentan su concentración en el zumo sin pulpa dada la mayor afinidad de estos por el agua y el efecto barrera que ejerce la pulpa sobre la recuperación de los mismos durante la destilación al actuar esta que limita la total salida de los mismos en la destilación.

#### IV.4.1.3.- *Componentes volátiles. HS-SPME*

La eliminación de la pulpa en el zumo de naranja afecta de igual forma que en el caso anterior a los constituyentes volátiles presentes en el espacio de cabeza del zumo refinado, ya que equivale a eliminar una barrera que ralentiza el paso de los mismos hacia el espacio de cabeza.

Ha de tenerse en cuenta que la técnica de SPME está basada en un equilibrio químico entre fases, en las que el coeficiente de reparto de cada componente entre las mismas queda afectado por las posibles variaciones sufridas en alguna de ellas, lo cual afecta a la capacidad de adsorción de la fibra sobre los componentes.

Realizamos el estudio del espacio de cabeza considerando dos recubrimientos poliméricos (PDMS y PA); al ser estos componentes de tan diferente naturaleza polar, la variación en constituyentes volátiles en el espacio de cabeza afecta en gran medida a la capacidad de adsorción de cada una de ellas.

#### IV.4.1.3.1.- *Extracción mediante PDMS*

A pesar de que tanto la matriz como el material adsorbente de la fibra compiten por atrapar analítos, la afinidad hacia la fibra es crucial en el muestreo en la técnica de SPME.

Por este motivo comenzamos el estudio fraccionado de los componentes en base a su naturaleza química. Los resultados del análisis en espacio de cabeza mediante PDMS en ambos tipos de zumo se reflejan las Tablas IV.4.1.3.-1 y IV.4.1.3.-2.

*Aldehídos.*- El estudio comparado de la concentración de aldehídos detectada en ambos zumos muestra un decrecimiento importante del contenido de los mismos tras la eliminación de la pulpa fina.

Hemos de considerar el hecho de que cuando los compuestos son polares la afinidad de los analítos por el recubrimiento de la fibra ha de superar la afinidad de los mismos por la matriz acuosa (Zhang y Pawliszyn, 1994).

El polidimetil xilosano por su naturaleza apolar es un recubrimiento ideal para la extracción de compuestos no polares de matrices acuosas, con lo cual, sí la eliminación de la pulpa favorece la retención de los componentes polares en la matriz acuosa, menor cantidad de componente será atrapado por el PDMS.

Tabla IV.4.1.3.-1 - **COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA REFINADO (10-13% S.I.). HS-SPME (PDMS).**

Componentes (mg/Kg)	Zumoo Refinado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	0,046 ± 0,079	0,478 ± 0,826	0,398 ± 0,472
Etanol	0,803 ± 0,712	6,441 ± 10,859	0,103 ± 0,206
Acetona	25,598 ± 7,770	52,730 ± 72,468	34,486 ± 13,226
Metil-vinil-cetona	4,100 ± 5,401	8,052 ± 16,105	1,318 ± 2,636
Acetato de etilo	0,430 ± 0,416	1,649 ± 1,496	0,736 ± 0,572
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	0,155 ± 0,208	0,018 ± 0,036
Etil-vinil-cetona	1,655 ± 0,471	1,692 ± 3,174	1,161 ± 0,631
Valeraldehido+2 Pentanol	0,235 ± 0,052	0,292 ± 0,311	0,186 ± 0,145
Butirato de metilo	0,013 ± 0,011	0,018 ± 0,036	0,014 ± 0,016
3-metil-1-Butanol	0,059 ± 0,102	0,038 ± 0,076	0,209 ± 0,283
Hexanal+Butirato de etilo	0,547 ± 0,072	0,716 ± 0,451	0,591 ± 0,208
Furfural	N.D.	0,970 ± 1,940	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,053 ± 0,046	0,046 ± 0,044	0,110 ± 0,204
Trans-2-Hexen 1-ol	0,669 ± 0,583	0,064 ± 0,129	0,134 ± 0,269
α-Pineno	6,472 ± 1,761	6,098 ± 1,880	7,134 ± 0,809
1-Heptanol	0,915 ± 0,275	1,563 ± 1,187	3,050 ± 2,689
Sabineno	2,631 ± 0,473	5,895 ± 3,308	5,361 ± 0,490
β-Pineno	0,372 ± 0,121	0,335 ± 0,067	0,422 ± 0,134
β-Mirceno	35,911 ± 40,017	13,160 ± 7,911	12,857 ± 1,727
Octanal	1,048 ± 1,687	0,848 ± 1,473	3,087 ± 2,613
α-Felandreno	2,690 ± 1,297	6,765 ± 8,217	3,008 ± 3,405
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,824 ± 0,488	0,427 ± 0,594	0,180 ± 0,041
α-Terpineno	14,503 ± 1,413	15,635 ± 8,355	26,830 ± 7,306

<b>Limoneno</b>	567,69 ± 107,06	467,83 ± 233,98	605,460 ± 23,46
<b>γ-Terpineno</b>	6,448 ± 0,430	6,976 ± 3,448	10,041 ± 2,686
<b>Octanol</b>	3,685 ± 0,208	4,074 ± 2,012	6,340 ± 3,384
<b>Linalol</b>	4,772 ± 1,753	5,071 ± 2,144	6,373 ± 2,298
<b>Nonanal</b>	0,177 ± 0,069	0,254 ± 0,136	1,012 ± 1,443
<b>Citronelal</b>	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,004	0,296 ± 0,575
<b>Terpinen-4-ol</b>	1,196 ± 0,211	1,212 ± 0,286	1,213 ± 0,433
<b>α-Terpineol</b>	3,020 ± 0,750	4,965 ± 2,345	7,152 ± 8,804
<b>Decanal</b>	0,198 ± 0,049	0,404 ± 0,104	0,925 ± 1,258
<b>Acetato de octilo</b>	0,007 ± 0,001	0,023 ± 0,005	0,040 ± 0,046
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,193 ± 0,015	0,395 ± 0,140	0,762 ± 0,766
<b>Carveol</b>	0,010 ± 0,016	0,085 ± 0,103	0,078 ± 0,064
<b>Neral</b>	0,007 ± 0,004	0,026 ± 0,021	0,005 ± 0,005
<b>Carvona</b>	0,076 ± 0,015	0,133 ± 0,079	0,254 ± 0,221
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,235 ± 0,045	0,137 ± 0,104	0,294 ± 0,136
<b>Geranial</b>	0,101 ± 0,002	0,086 ± 0,033	0,279 ± 0,216
<b>Perialdehido</b>	0,036 ± 0,021	0,035 ± 0,024	0,038 ± 0,048
<b>Undecanal</b>	0,013 ± 0,003	0,018 ± 0,011	0,064 ± 0,096
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,010 ± 0,009	0,028 ± 0,021	0,029 ± 0,022
<b>Acet. nerilo</b>	0,020 ± 0,005	0,029 ± 0,010	0,032 ± 0,037
<b>Acet. geranilo</b>	0,023 ± 0,011	0,043 ± 0,018	0,188 ± 0,347
<b>Dodecanal</b>	0,069 ± 0,009	0,121 ± 0,068	0,345 ± 0,523
<b>Antranilato de etilo</b>	0,002 ± 0,004	0,284 ± 0,319	0,124 ± 0,160
<b>Cariofileno</b>	0,019 ± 0,003	0,028 ± 0,021	0,143 ± 0,174
<b>α-Humuleno</b>	0,013 ± 0,004	0,017 ± 0,009	0,085 ± 0,136
<b>Dodecanol</b>	0,028 ± 0,028	0,016 ± 0,014	0,100 ± 0,146
<b>Valenceno</b>	0,851 ± 0,411	1,343 ± 0,956	1,702 ± 2,575

Tabla IV.4.1.3.-2.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA CENTRIFUGADO (<3%.S.I.). HS-SPME (PDMS).**

Componentes (mg/Kg)	Zumó (<3% S.I.)		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	0,112 ± 0,194	0,044 ± 0,099	0,099 ± 0,116
Etanol	0,267 ± 0,463	0,304 ± 0,681	0,592 ± 0,416
Acetona	25,289 ± 10,437	31,220 ± 17,635	34,480 ± 3,509
Metil-vinil-cetona	0,341 ± 0,591	N.D.	2,078 ± 2,413
Acetato de etilo	0,867 ± 1,033	0,674 ± 0,229	0,691 ± 0,491
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	0,081 ± 0,181	N.D.
Etil-vinil-cetona	1,548 ± 0,417	1,298 ± 1,867	1,582 ± 0,723
Valeraldehido+2 Pentanol	0,222 ± 0,102	0,433 ± 0,338	0,518 ± 0,788
Butirato de metilo	0,010 ± 0,017	0,011 ± 0,012	0,020 ± 0,029
3-metil-1-Butanol	N.D.	0,153 ± 0,342	0,801 ± 1,546
Hexanal+Butirato de etilo	0,513 ± 0,046	0,831 ± 0,680	0,669 ± 0,249
Furfural	N.D.	N.D.	0,200 ± 0,4
Trans-2-Hexenal	0,003 ± 0,005	0,093 ± 0,118	0,025 ± 0,03
Trans-2-Hexen 1-ol	0,130 ± 0,125	0,030 ± 0,068	N.D.
α-Pineno	0,994 ± 0,231	1,261 ± 0,698	0,641 ± 0,183
1-Heptanol	0,019 ± 0,033	0,049 ± 0,059	0,077 ± 0,123
Sabineno	0,498 ± 0,327	1,029 ± 0,677	0,469 ± 0,251
β-Pineno	0,016 ± 0,014	0,161 ± 0,203	0,051 ± 0,065
β-Mirceno	1,830 ± 0,477	2,256 ± 1,090	1,244 ± 0,361
Octanal	0,773 ± 0,371	0,827 ± 0,288	1,1835 ± 0,132
α-Felandreno	0,036 ± 0,008	0,318 ± 0,402	0,101 ± 0,051
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,174 ± 0,268	0,038 ± 0,029	0,035 ± 0,013
α-Terpineno	1,469 ± 0,768	1,597 ± 1,399	1,240 ± 0,837



<b>Limoneno</b>	59,894 ± 10,907	68,301 ± 24,511	44,346 ± 9,443
<b>γ-Terpineno</b>	0,937 ± 0,096	1,209 ± 0,615	0,837 ± 0,130
<b>Octanol</b>	0,646 ± 0,396	0,607 ± 0,233	0,581 ± 0,153
<b>Linalol</b>	3,222 ± 1,232	3,452 ± 1,283	3,500 ± 0,544
<b>Nonanal</b>	0,074 ± 0,007	0,076 ± 0,017	0,081 ± 0,009
<b>Citronelal</b>	0,006 ± 0,0006	0,011 ± 0,003	0,009 ± 0,002
<b>Terpinen-4-ol</b>	1,160 ± 0,135	1,236 ± 0,309	0,825 ± 0,306
<b>α-Terpineol</b>	1,061 ± 0,433	0,987 ± 0,595	0,973 ± 0,197
<b>Decanal</b>	0,222 ± 0,026	0,145 ± 0,139	0,259 ± 0,195
<b>Acetato de octilo</b>	0,021 ± 0,025	0,009 ± 0,005	0,037 ± 0,053
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,130 ± 0,007	0,163 ± 0,095	0,154 ± 0,010
<b>Carveol</b>	tr	0,048 ± 0,080	0,028 ± 0,020
<b>Neral</b>	0,007 ± 0,001	0,035 ± 0,038	0,007 ± 0,002
<b>Carvona</b>	0,053 ± 0,002	0,073 ± 0,037	0,116 ± 0,051
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,077 ± 0,038	0,109 ± 0,069	0,059 ± 0,010
<b>Geranial</b>	0,031 ± 0,023	0,048 ± 0,025	0,028 ± 0,011
<b>Perialdehido</b>	0,036 ± 0,034	0,046 ± 0,035	0,085 ± 0,008
<b>Undecanal</b>	0,010 ± 0,002	0,009 ± 0,007	0,010 ± 0,002
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,011 ± 0,004	0,025 ± 0,016	0,016 ± 0,006
<b>Acet. nerilo</b>	0,012 ± 0,002	0,013 ± 0,008	0,011 ± 0,001
<b>Acet. geranilo</b>	0,015 ± 0,005	0,025 ± 0,018	0,008 ± 0,005
<b>Dodecanal</b>	0,058 ± 0,005	0,041 ± 0,007	0,053 ± 0,017
<b>Antranilato de etilo</b>	0,001 ± 0,002	0,199 ± 0,261	0,106 ± 0,122
<b>Cariofileno</b>	0,014 ± 0,003	0,011 ± 0,007	0,008 ± 0,005
<b>α-Humuleno</b>	0,008 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,005 ± 0,004
<b>Dodecanol</b>	0,030 ± 0,012	0,036 ± 0,013	0,009 ± 0,007
<b>Valenceno</b>	0,594 ± 0,270	0,581 ± 0,335	0,406 ± 0,318

*Alcoholes.*- El fenómeno detectado en los alcoholes tras la eliminación de la pulpa fina es similar al definido anteriormente con los aldehídos, pero también se ha de tener en cuenta la naturaleza polar de estos componentes y los coeficientes de reparto entre las distintas fases que conforman el sistema.

La adición de sal a la matriz acuosa genera el efecto conocido como “salting-out”, mediante el que se favorece el enriquecimiento de componentes polares en el espacio de cabeza, pero la afinidad de la fibra sigue siendo menor que la existente en la matriz acuosa, por lo que se observan disminuciones de adsorción comprendidas entre 80 y 90% de los componentes extremadamente polares como etanol, trans-2-hexen-1ol, 1-heptanol, octanol,  $\alpha$ -terpineol y geraniol.

*Hidrocarburos terpénicos.*- La afinidad de estos componentes apolares hacia la fibra es elevada, pero también hemos de considerar la pérdida de terpenos con la eliminación de la pulpa donde se localizan.

Los resultados obtenidos muestran una pérdida en concentración de componentes térpenicos comprendida entre un 80 y un 90% para la mayoría de los casos, con excepción del valenceno, componente en el que se observa sólo una disminución próxima al 60%.

*Ésteres y Cetonas.*- Estos componentes se caracterizan por presentar una polaridad media. El estudio comparado de las concentraciones detectadas mediante PDMS demuestra que apenas modifican su concentración con la eliminación de la pulpa. Los resultados coinciden con los encontrados en el análisis de componentes volátiles totales, por lo que en este caso la dinámica de adsorción de la fibra sobre estos componentes ejerce una menor influencia que la propia eliminación de la pulpa fina en el zumo refinado.

#### IV.4.1.3.2.- *Extracción mediante PA*

El poliacrilato, considerado como material absorbente muy polar, extrae de forma eficiente componentes de naturaleza afín pero no permite elevada sensibilidad en la extracción de compuestos de naturaleza apolar (Zhang y Pawliszyn, 1994).

El análisis de la influencia de la eliminación de la pulpa en el zumo refinado sobre la fracción aromática se especifica en las Tablas IV.4.1.3.-4 y IV.4.1.3.-5.

Comenzamos el estudio comparado de ambos zumos. La influencia de la eliminación de la pulpa fina y la diferente capacidad de adsorción del PA modifican las dos constantes de reparto  $K_1$  y  $K_2$  de cada uno de los componentes existentes entre las fases del sistema. La eliminación de la pulpa supone una disminución de la concentración de algunos componentes y facilita a la vez el enriquecimiento de otros en el espacio de cabeza.

*Aldehídos.*- Dada su naturaleza polar la adsorción de estos componentes queda bastante favorecida en este recubrimiento polimérico, y no se detectan diferencias importantes de adsorción en los aldehídos de mayor volatilidad, con la excepción del octanal que aumenta de forma considerable su concentración por la eliminación de la pulpa.

Los aldehídos de mayor peso molecular y menor polaridad son detectados en menor concentración; al estar más asociados a la pulpa, disminuyen su presencia por la centrifugación.

*Alcoholes.*- Al igual que en el análisis de componentes volátiles totales y en espacio de cabeza mediante PDMS, se observa una disminución importante del contenido en alcoholes en las muestras en las que ha sido eliminada la pulpa, que se destaca en alcoholes de mayor volatilidad.

Tabla IV.4.1.3.-4.- COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA REFINADO (10-13% S.I.). HS-SPME (PA).

Componentes (mg/Kg)	Zumó Refinado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehído	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	8,048 ± 7,220	14,264 ± 4,702	N.D.
Acetona	148,457 ± 45,289	207,276 ± 41,914	157,161 ± 75,298
Metil-vinil-cetona	N.D.	4,263 ± 0	N.D.
Acetato de etilo	0,217 ± 0,376	1,313 ± 0,768	0,553 ± 0,607
1-Butanol	0,060 ± 0,104	0,381 ± 0,522	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	0,069 ± 0,088	0,136 ± 0,160	0,277 ± 0,162
Valeraldehído+2 Pentanol	0,157 ± 0,185	0,236 ± 0,248	0,068 ± 0,118
Butirato de metilo	N.D.	0,053 ± 0,092	0,015 ± 0,013
3-metil-1-Butanol	0,106 ± 0,101	0,407 ± 0,155	0,311 ± 0,112
Hexanal+Butirato de etilo	0,443 ± 0,097	0,566 ± 0,395	0,315 ± 0,047
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,218 ± 0,061	0,203 ± 0,288	0,109 ± 0,083
Trans-2-Hexen 1-ol	0,612 ± 0,117	0,931 ± 1,163	0,366 ± 0,290
α-Pineno	0,891 ± 0,211	1,485 ± 0,496	0,874 ± 0,221
1-Heptanol	0,019 ± 0,0032	0,033 ± 0,031	0,023 ± 0,020
Sabineno	0,455 ± 0,072	1,999 ± 0,976	0,656 ± 0,116
β-Pineno	0,025 ± 0,006	0,026 ± 0,045	0,028 ± 0,025
β-Mirceno	2,36 ± 0,462	3,674 ± 1,086	1,788 ± 1,540
Octanal	0,106 ± 0,094	0,148 ± 0,135	0,273 ± 0,364
α-Felandreno	0,138 ± 0,177	0,459 ± 0,708	0,329 ± 0,414
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,126 ± 0,111	0,285 ± 0,448	0,064 ± 0,101
α-Terpineno	0,224 ± 0,094	0,11 ± 0,184	tr

<b>Limoneno</b>	71,556 ± 6,676	94,285 ± 14,943	80,554 ± 14,088
<b>γ-Terpineno</b>	0,189 ± 0,015	0,339 ± 0,039	0,180 ± 0,161
<b>Octanol</b>	1,010 ± 0,161	1,368 ± 0,149	1,349 ± 0,559
<b>Linalol</b>	1,025 ± 0,472	1,448 ± 0,202	1,170 ± 0,208
<b>Nonanal</b>	0,077 ± 0,027	0,159 ± 0,045	0,121 ± 0,077
<b>Citronelal</b>	0,006 ± 0,002	0,044 ± 0,050	0,008 ± 0,002
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,873 ± 0,182	1,150 ± 0,221	0,902 ± 0,284
<b>α-Terpineol</b>	1,552 ± 0,647	3,878 ± 1,819	1,825 ± 0,902
<b>Decanal</b>	0,359 ± 0,055	0,883 ± 0,355	0,643 ± 0,218
<b>Acetato de octilo</b>	0,015 ± 0,001	0,070 ± 0,020	0,041 ± 0,005
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,131 ± 0,016	0,322 ± 0,106	0,246 ± 0,098
<b>Carveol</b>	N.D.	0,127 ± 0,176	0,210 ± 0,117
<b>Neral</b>	0,004 ± 0,001	0,010 ± 0,005	0,004 ± 0,002
<b>Carvona</b>	0,1 ± 0,026	0,273 ± 0,126	0,201 ± 0,077
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,179 ± 0,018	0,280 ± 0,048	0,283 ± 0,1608
<b>Geranial</b>	0,092 ± 0,025	0,140 ± 0,041	0,198 ± 0,132
<b>Perialdehido</b>	0,047 ± 0,027	0,108 ± 0,008	0,068 ± 0,058
<b>Undecanal</b>	0,025 ± 0,006	0,041 ± 0,013	0,101 ± 0,120
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,010 ± 0,006	0,032 ± 0,013	0,019 ± 0,004
<b>Acet. nerilo</b>	0,012 ± 0,002	0,020 ± 0,023	0,015 ± 0,001
<b>Acet.geranilo</b>	0,011 ± 0,001	0,035 ± 0,015	0,014 ± 0,002
<b>Dodecanal</b>	0,082 ± 0,019	0,128 ± 0,019	0,111 ± 0,031
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	0,192 ± 0,332
<b>Cariofileno</b>	0,022 ± 0,001	0,034 ± 0,010	0,020 ± 0,005
<b>α-Humuleno</b>	0,013 ± 0,003	0,024 ± 0,007	0,020 ± 0,011
<b>Dodecanol</b>	0,028 ± 0,009	0,035 ± 0,025	0,019 ± 0,002
<b>Valenceno</b>	0,894 ± 0,311	1,172 ± 0,942	0,526 ± 0,143

Tabla IV.4.1.3.-5.- COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA CENTRIFUGADO (<3%.S.I.). HS-SPME (PA).

Componentes (mg/Kg)	Zumo (<3% S.I.)		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	4,608 ± 3,991	2,0422 ± 4,566	N.D.
Acetona	111,452 ± 30,428	225,146 ± 105,273	182,620 ± 22,856
Metil-vinil-cetona	0,85 ± 1,472	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	0,021 ± 0,037	0,946 ± 0,834	0,521 ± 0,424
1-Butanol	N.D.	0,078 ± 0,129	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	tr	N.D.
Etil-vinil-cetona	0,292 ± 0,323	0,186 ± 0,164	0,140 ± 0,185
Valeraldehido+2 Pentanol	0,209 ± 0,183	0,197 ± 0,215	0,060 ± 0,056
Butirato de metilo	0,011 ± 0,010	0,019 ± 0,043	N.D.
3-metil-1-Butanol	0,073 ± 0,064	0,201 ± 0,201	0,298 ± 0,101
Hexanal+Butirato de etilo	0,426 ± 0,029	0,688 ± 0,594	0,419 ± 0,145
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,017 ± 0,016	0,057 ± 0,079	0,014 ± 0,025
Trans-2-Hexen 1-ol	0,122 ± 0,055	0,193 ± 0,163	0,066 ± 0,046
α-Pineno	0,737 ± 0,188	0,531 ± 0,093	0,555 ± 0,379
1-Heptanol	0,006 ± 0,006	0,017 ± 0,016	0,005 ± 0,005
Sabineno	0,311 ± 0,224	0,487 ± 0,161	0,288 ± 0,299
β-Pineno	0,049 ± 0,033	0,093 ± 0,181	0,077 ± 0,049
β-Mirceno	1,964 ± 0,503	1,605 ± 0,281	1,589 ± 0,896
Octanal	0,442 ± 0,073	1,397 ± 2,192	0,560 ± 0,160
α-Felandreno	0,062 ± 0,056	0,062 ± 0,060	0,126 ± 0,036
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,050 ± 0,048	0,043 ± 0,041	0,018 ± 0,021
α-Terpineno	0,072 ± 0,076	0,261 ± 0,072	0,621 ± 0,473

<b>Limoneno</b>	46,423 ± 37,853	50,805 ± 19,521	43,349 ± 30,861
<b>γ-Terpineno</b>	0,101 ± 0,086	0,212 ± 0,049	0,189 ± 0,085
<b>Octanol</b>	0,440 ± 0,396	0,391 ± 0,170	0,391 ± 0,220
<b>Linalol</b>	1,139 ± 0,456	1,141 ± 0,342	1,247 ± 0,319
<b>Nonanal</b>	0,133 ± 0,016	0,132 ± 0,037	0,163 ± 0,043
<b>Citronelal</b>	0,007 ± 0,0001	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,002
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,843 ± 0,165	2,278 ± 2,855	0,814 ± 0,335
<b>α-Terpineol</b>	0,503 ± 0,235	0,596 ± 0,206	0,525 ± 0,047
<b>Decanal</b>	0,358 ± 0,065	0,451 ± 0,145	0,551 ± 0,235
<b>Acetato de octilo</b>	0,009 ± 0,003	0,024 ± 0,007	0,026 ± 0,012
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,084 ± 0,018	0,121 ± 0,030	0,093 ± 0,033
<b>Carveol</b>	N.D.	0,057 ± 0,115	0,331 ± 0,421
<b>Neral</b>	0,004 ± 0,001	0,009 ± 0,011	0,004 ± 0,001
<b>Carvona</b>	0,070 ± 0,007	0,114 ± 0,034	0,162 ± 0,099
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,072 ± 0,045	0,086 ± 0,023	0,068 ± 0,016
<b>Geranial</b>	0,030 ± 0,027	0,023 ± 0,008	0,025 ± 0,010
<b>Perialdehido</b>	0,073 ± 0,003	0,088 ± 0,028	0,124 ± 0,031
<b>Undecanal</b>	0,018 ± 0,005	0,017 ± 0,004	0,020 ± 0,008
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,007 ± 0,005	0,012 ± 0,003	0,012 ± 0,006
<b>Acet. nerilo</b>	0,009 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,011 ± 0,005
<b>Acet. geranilo</b>	0,011 ± 0,004	0,032 ± 0,049	0,010 ± 0,005
<b>Dodecanal</b>	0,037 ± 0,027	0,050 ± 0,011	0,074 ± 0,048
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,014 ± 0,005	0,016 ± 0,004	0,014 ± 0,007
<b>α-Humuleno</b>	0,008 ± 0,003	0,011 ± 0,005	0,014 ± 0,009
<b>Dodecanol</b>	0,017 ± 0,008	0,017 ± 0,011	0,013 ± 0,0007
<b>Valenceno</b>	0,542 ± 0,308	0,551 ± 0,424	0,371 ± 0,058

De nuevo la naturaleza polar del recubrimiento polimérico favorece la afinidad por los alcoholes. En conjunto la disminución de la cantidad retenida por ambos recubrimientos poliméricos se debe a la pérdida por la eliminación de la pulpa en el zumo refinado.

*Hidrocarburos terpénicos.*- En este caso se produce una disminución importante del contenido en estos componentes, aunque destaca el hecho de que esta disminución no supera a la que se detecta con PDMS, consecuencia del diferente coeficiente de reparto entre ambos recubrimientos poliméricos y los componentes terpénicos. De aquí que la cantidad de analito que debe ser retenida por el recubrimiento sea menor en PA que en PDMS, ya que al tener PA menor capacidad para la retención de terpenos menor influencia tiene el cambio de la constante global K de reparto fibra-matriz acuosa detectado; de hecho, esta constante de reparto para componentes apolares con polidimetil xilosano resulta mayor respecto al poliacrilato.

*Ésteres y Cetonas.*- En estos componentes de polaridad media la afinidad de los mismos hacia el PA es pequeña y no se observan diferencias importantes en el contenido de los mismos después de separar la pulpa, lo que coincide con lo detectado por PDMS y con los resultados del análisis de componentes volátiles totales. En base a esto ratificamos lo anteriormente descrito en el caso de la extracción con PDMS: la escasa disminución del contenido de ésteres y cetonas únicamente se debe a la propia eliminación de la pulpa y no a la mayor o menor afinidad de los componentes hacia el recubrimiento polimérico de la fibra.



IV.4.1.4.- *Análisis estadístico*

El resultado del cálculo estadístico de la adsorción de los componentes en PDMS en ambas modalidades de zumo queda reflejado en la Tabla IV.4.1.4.-1.

Tabla IV.4.1.4.-1.- **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO (10-15% S.I.)-ZUMO CENTRIFUGADO (<3% S.I.) HS-SPME (PDMS).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>10-15% S.I.</b>	4,92 ± 3,14 <sup>a</sup>	22,45 ± 7,47 <sup>a</sup>	609.70 ± 156,40 <sup>a</sup>	1,31 ± 1,28 <sup>a</sup>	31,83 ± 14,44 <sup>a</sup>
<b>&lt;3% S.I.</b>	2,69 ± 1,03 <sup>b</sup>	7.24 ± 1,85 <sup>b</sup>	65,07 ± 21,85 <sup>b</sup>	0,90 ± 0,57 <sup>a</sup>	33,14 ± 11,83 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

Los resultados estadísticos confirman lo expresado anteriormente: se detectan diferencias significativas importantes en el contenido en aldehídos, alcoholes e hidrocarburos terpénicos, pero no en el caso de ésteres y cetonas.

Finalmente, cabe destacar que las disminuciones encontradas en el contenido de aldehidos y alcoholes no detectadas en los componentes volátiles totales al reducir el contenido en pulpa del zumo refinado son debidas a la propia dinámica de adsorción de los componentes de naturaleza polar sobre PDMS.

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos con la aplicación del recubrimiento de PA sobre ambas modalidades de zumo se presenta en la Tabla IV.4.1.4.-2.

Los diferencias obtenidas son coincidentes con las determinadas en el método de extracción de componentes volátiles totales; únicamente encontramos diferencias estadísticamente significativas en el contenido de terpenos en ambas muestras de zumo, como consecuencia de la mayor afinidad de los mismos hacia la pulpa del zumo y el menor coeficiente de reparto entre la fibra polar y el componente apolar.

Tabla IV.4.1.4.-2.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO (10-15% S.I.)-ZUMO CENTRIFUGADO (<3% S.I.). HS-SPME (PA).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>10-15% S.I.</b>	2,08 ± 0,85 <sup>a</sup>	10,18 ± 11,48 <sup>a</sup>	88,61 ± 17,41 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,79 <sup>a</sup>	245,40 ± 137,20 <sup>a</sup>
<b>&lt;3% S.I.</b>	2,45 ± 1,46 <sup>a</sup>	5,45 ± 5,09 <sup>a</sup>	56,22 ± 21,13 <sup>b</sup>	0,65 ± 0,75 <sup>a</sup>	232,90 ± 121,10 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

Para establecer una conclusión conjunta de los resultados obtenidos con el empleo de ambos recubrimientos poliméricos sobre muestras con diferentes características de la fase acuosa, realizamos un tratamiento estadístico de los datos mediante un test de varianza simple.

La adecuación del recubrimiento polimérico de la fibra en la determinación de componentes volátiles en función de la naturaleza de la fase acuosa resulta de interés, ya que nos da una primera información del tipo de polímero más adecuado para conseguir un máximo rendimiento de la técnica HS-SPME.

La comparación estadística queda reflejada en las tablas IV.4.1.4.-3 y IV.4.1.4.-4. para el zumo refinado y el zumo centrifugado, respectivamente.

Existen diferencias significativas en la determinación de aldehídos, alcoholes, terpenos y cetonas, mediante ambos recubrimientos poliméricos -siendo a nivel cuantitativo más abundante la determinación mediante PDMS-, lo que confirma la mayor capacidad de retención de componentes volátiles de la fibra apolar sobre muestras acuosas con un contenido significativo de sólidos insolubles, a pesar de la elevada afinidad del recubrimiento de PA sobre los componentes polares.

Tabla IV.4.1.4.-3.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE EN ZUMO REFINADO (10-15% S.I.).PDMS-PA**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ÉSTERES	CETONAS
<b>PDMS</b>	4,97 ± 3,14 <sup>a</sup>	22,45 ± 7,47 <sup>a</sup>	609,7 ± 156,40 <sup>a</sup>	1,32 ± 1,28 <sup>a</sup>	31,83 ± 14,44 <sup>a</sup>
<b>PA</b>	2,08 ± 0,85 <sup>b</sup>	10,18 ± 11,48 <sup>b</sup>	88,61 ± 17,41 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,79 <sup>a</sup>	245,4 ± 137,20 <sup>b</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos de la comparación de la capacidad de retención de ambos recubrimientos sobre muestras con un contenido mínimo en sólidos insolubles (Tabla IV.4.1.4.-4), no muestran diferencias significativas en la determinación de componentes volátiles, siendo los resultados bastante próximos entre sí. Esto nos demuestra el diferente efecto que tiene la modificación de los coeficientes de reparto sobre ambos recubrimientos; además ha de considerarse el hecho de que la afinidad de los componentes hacia la fase acuosa en

algunos de los casos supera a la afinidad hacia la fibra, con lo cual la posibilidad de adsorción de esos componentes por parte de la fibra disminuye, como sucede en el caso de aldehídos y alcoholes con PA, que llegan a igualarse con las determinaciones mediante PDMS.

También podemos resaltar el hecho de que las muestras con un contenido en componentes terpénicos bajo, como hemos visto con las muestras de zumo sin pulpa, dada la afinidad existente entre estos componentes y el recubrimiento de PDMS, la escasa adsorción de los terpenos favorece la adsorción de otros componentes de naturaleza polar, llegando a igualar su capacidad de adsorción a la del PA, ya que se contrarresta el efecto de la afinidad de los componentes polares hacia la matriz acuosa en el caso de PA y el efecto de la menor adsorción de terpenos en PDMS.

Tabla IV.4.1.4.-4.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE PDMS-PA EN ZUMO CENTRIFUGADO (<3% S.I.)-**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>PDMS</b>	2,69 ± 1,03 <sup>a</sup>	7,24 ± 1,85 <sup>a</sup>	65,07 ± 21,85 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,57 <sup>a</sup>	33,14 ± 11,83 <sup>a</sup>
<b>PA</b>	2,45 ± 1,46 <sup>a</sup>	5,45 ± 5,09 <sup>a</sup>	56,22 ± 21,13 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,75 <sup>a</sup>	232,9 ± 121,10 <sup>b</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

#### IV.4.2.- Efecto del desaireado-desaceitado

Una vez que ha sido estandarizado el contenido en pulpa del zumo, se somete a desaireación con objeto de eliminar el aire disuelto

que puede oxidar el producto. La desaireación se efectúa en una cámara de vacío. Los constituyentes volátiles que se separan en el desaireador son incorporados posteriormente al zumo ya desaireado.

El zumo sufre en la cámara de desaireación una pérdida importante de su fracción aromática como consecuencia de la aplicación de vacío y sobre todo el calentamiento a temperaturas moderadas. Este apartado estudia el efecto de la desaireación, por comparación de la fracción volátil total y en espacio de cabeza en el zumo refinado y la presente en el zumo desaireado.

#### *IV.4.2.1.- Componentes volátiles. SDE*

La influencia de la desaireación sobre los componentes volátiles totales determinados mediante SDE, dadas las características que definen el método, únicamente puede ser determinada para aquellos componentes de menor volatilidad que el hexano. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla IV.4.2.1.-1.

En la línea de procesamiento correspondiente al diagrama de transformación del zumo la pulpa fina, se reincorpora al zumo centrifugado para regular un contenido de pulpa estándar del 10%. Dado que durante la centrifugación no se produce alteración en los constituyentes aromáticos del conjunto zumo-pulpa, y que el porcentaje final de pulpa resulta muy próximo al inicial en el zumo refinado, para la evaluación del desaireado-desaceitado sobre los volátiles del zumo tratado se relacionan los mismos con los presentes en el zumo refinado de procedencia (Tabla IV.4.1.1.-1).

Tabla IV.4.2.1.-1.- COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN ZUMO DE NARANJA DESAIREADO-DESACEITADO

Componentes (mg/Kg)	Zumó Desaireado-Desaceitado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	1,914 ± 0,533	0,931 ± 1,317	N.D.
Valeraldehido+2 Pentanol	1,339 ± 0,482	0,789 ± 1,116	N.D.
Butirato de metilo	N.D.	N.D.	N.D.
3-metil-1-Butanol	N.D.	0,044 ± 0,063	0,126 ± 0,0007
Hexanal+Butirato de etilo	0,107 ± 0,097	0,093 ± 0,131	0,073 ± 0,018
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	0,510 ± 0,315	1,004 ± 0,189	1,319 ± 0,551
1-Heptanol	0,067 ± 0,066	0,031 ± 0,022	0,072 ± 0,102
Sabineno	0,064 ± 0,058	N.D.	0,115 ± 0,162
β-Pineno	0,019 ± 0,033	0,081 ± 0,115	0,144 ± 0,001
Mirceno	2,093 ± 1,438	3,416 ± 0,678	4,829 ± 2,218
Octanal	0,290 ± 0,251	0,291 ± 0,068	0,215 ± 0,304
α-Felandreno	N.D.	N.D.	0,096 ± 0,135
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,222 ± 0,167	0,216 ± 0,032	0,271 ± 0,072
α-Terpineno	N.D.	0,151 ± 0,071	0,188 ± 0,019

<b>Limoneno</b>	120,463 ± 85,69	193,788 ± 44,65	282,648 ± 136,69
<b>γ-Terpineno</b>	0,139 ± 0,076	0,327 ± 0,107	0,365 ± 0,041
<b>Octanol</b>	0,467 ± 0,403	0,700 ± 0,282	1,072 ± 0,072
<b>Linalol</b>	1,720 ± 1,504	1,622 ± 0,109	2,043 ± 0,319
<b>Nonanal</b>	0,115 ± 0,068	0,071 ± 0,002	0,121 ± 0,057
<b>Citronelal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,663 ± 0,445	1,152 ± 0,186	1,286 ± 0,504
<b>α-Terpineol</b>	0,488 ± 0,326	1,364 ± 0,116	1,670 ± 0,821
<b>Decanal</b>	0,573 ± 0,468	0,687 ± 0,155	0,925 ± 0,239
<b>Acetato de octilo</b>	N.D.	0,088 ± 0,125	N.D.
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,142 ± 0,113	0,185 ± 0,002	0,212 ± 0,067
<b>Carveol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Neral</b>	0,077 ± 0,068	0,084 ± 0,118	0,019 ± 0,027
<b>Carvona</b>	0,036 ± 0,063	0,047 ± 0,067	0,103 ± 0,022
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,079 ± 0,070	0,109 ± 0,154	0,164 ± 0,012
<b>Geranial</b>	0,110 ± 0,114	0,183 ± 0,014	0,333 ± 0,166
<b>Perialdehido</b>	0,017 ± 0,029	N.D.	0,020 ± 0,029
<b>Undecanal</b>	N.D.	0,029 ± 0,041	0,031 ± 0,044
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	N.D.	0,070 ± 0,099	0,016 ± 0,022
<b>Acet. Nerilo</b>	0,041 ± 0,069	0,048 ± 0,068	0,097 ± 0,040
<b>Acet. geranilo</b>	0,027 ± 0,033	0,052 ± 0,074	0,060 ± 0,005
<b>Dodecanal</b>	0,048 ± 0,051	0,235 ± 0,150	0,187 ± 0,083
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,043 ± 0,047	0,110 ± 0,054	0,178 ± 0,107
<b>α-Humuleno</b>	0,320 ± 0,452	0,016 ± 0,022	0,049 ± 0,014
<b>Dodecanol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	0,595 ± 0,549	3,014 ± 1,412	10,426 ± 12,528

Como cabría esperar, el comportamiento generalizado es de pérdidas bastante considerables de los componentes de volatilidad alta y media, comparadas con las concentraciones detectadas en el zumo refinado con un contenido en sólidos insolubles del 13%.

Sin embargo, a nivel cualitativo no se observan pérdidas de componentes a excepción de  $\alpha$ -terpineno, carveol y dodecanol que no son detectados en el zumo desaireado.

*Aldehídos.-* El comportamiento generalizado de los mismos muestra pérdidas importantes que oscilan entre un 70 y un 90% del contenido inicial a la entrada del desaireador, siendo especialmente significativo en los componentes de elevada volatilidad: hexanal y octanal. Aldehídos característicos del aroma del zumo de naranja como decanal, neral y geranial merman su contenido en una proporción próxima al 80%; estos componentes son considerados por Shaw (1991) como importantes contribuidores al aroma del zumo.

También destacamos la escasa pérdida de componentes de baja volatilidad. Dodecanal sólo presenta una disminución inferior al 40% como consecuencia del sistema de desaireado, en las condiciones de operación aplicadas.

*Alcoholes.-* Estos componentes también sufren pérdidas importantes tras el desaireado del zumo, pero no son tan significativas como en el caso de los aldehídos. Las pérdidas detectadas oscilan entre un 50 y un 75%, siendo más significativas en los componentes de mayor volatilidad, a excepción de 1-heptanol en el que no son observadas diferencias significativas. Carveol y dodecanol no se detectan en el zumo desaireado, probablemente debido a su escasa presencia en el zumo inicial.



El aumento de la concentración del  $\alpha$ -terpineol está relacionado con los procesos de calentamiento del zumo (Slater y Watkins, 1964). Sin embargo, las condiciones de calentamiento en la desaireación no resultan muy enérgicas y también los resultados demuestran una disminución en el zumo desaireado.

*Hidrocarburos terpénicos.-* Estos componentes presentan comportamientos distintos en relación al resto de los constituyentes estudiados.

En general se observa una disminución importante en los terpenos de mayor volatilidad, caso de  $\beta$ -pineno y sabineno que disminuyen su concentración en un nivel próximo al 90%, junto con  $\alpha$ -felandreno componente que no llega a ser detectado en el zumo desaireado.

Diferente es el comportamiento de terpenos de menor volatilidad como cariofileno,  $\alpha$ -humuleno y valenceno que no modifican su concentración de forma significativa por efecto de la desaireación.

*Ésteres y Cetonas.-* Como consecuencia de las limitaciones de detección del SDE, apenas si son detectados los ésteres y cetonas que presentan una volatilidad elevada. En este caso concreto, destacamos la pérdida total de butirato de metilo, considerado como un importante contribuyente al aroma fresco de la naranja, mientras que etil-vinil-cetona, también definitoria de la fracción aromática del zumo, tiene pérdidas escasas.

El resto de componentes analizados presentan disminuciones en su concentración comprendidas entre un 40 y un 50%. Destaca también la carvona, considerada como índice de degradación del zumo por efecto de elevadas temperaturas, que en este caso disminuye.

Estos resultados revelan que la desaireación en las condiciones de trabajo utilizadas conlleva una pérdida importante del contenido en

componentes volátiles, pero no genera la aparición de componentes indeseados por efecto del tratamiento térmico al que es sometido el zumo.

#### IV.4.2.2.- *Análisis estadístico*

El análisis de varianza simple aplicado sobre el valor medio de la suma de concentraciones de todos los componentes, ratifica los resultados comentados anteriormente, ya que se detectan diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de aldehídos, alcoholes y terpenos, no siendo así en el caso de cetonas y ésteres como consecuencia de su escasa volatilidad. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla IV.4.2.-2.

Lafuente *et al.*, en 1982, estudian los factores que afectan a la recuperación y concentración de la fracción aromática del zumo de naranja, así como la calidad del zumo reconstituido por reincorporación de aromas. Los componentes estudiados por estos autores son de naturaleza terpénica junto con aldehídos y alcoholes de volatilidad media, y demuestran que el proceso de recuperación de aromas mediante rectificación es bastante efectivo a pesar de algunas pérdidas que detectan en estos componentes.

Durante el proceso de desaireado del zumo, el efecto de la temperatura y el vacío provoca el arrastre de los componentes volátiles con el vapor de agua y la condensación de los mismos en la parte superior del tanque equivale a un sistema de recuperación de componentes volátiles, por lo que podemos contrastar nuestros resultados con los obtenidos por estos autores, quienes a su vez afirman que aunque se incremente la cantidad de componentes volátiles al zumo reconstituido no se logra mejorar de forma significativa el grado de aceptación del mismo.

Tabla IV.4.2.2.-2-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO (10-15% S.I.)-ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO.**

	<b>ALDEHIDOS</b>	<b>ALCOHOLES</b>	<b>H.TERPÉNICOS</b>	<b>ESTERES</b>	<b>CETONAS</b>
<b>REFINADO</b>	7,33 ± 5,41 <sup>a</sup>	18,63 ± 8,24 <sup>a</sup>	747,90 ± 456,20 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,54 <sup>a</sup>	1,52 ± 1,46 <sup>a</sup>
<b>DESAIREADO</b>	2,40 ± 1,12 <sup>b</sup>	4,94 ± 2,15 <sup>b</sup>	196,90 ± 114,20 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,14 ± 1,03 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

#### IV.4.2.3.- *Componentes volátiles. HS-SPME*

En el estudio del espacio de cabeza, dada la mayor riqueza de componentes de elevada volatilidad en esta fase, resulta más significativo el efecto de la desaireación, como consecuencia de las mayores pérdidas sufridas por los componentes más volátiles que confieren al zumo el aroma frutal tan característico.

El estudio de componentes volátiles se lleva a cabo mediante la aplicación de SPME, empleando al igual que en los casos anteriores los dos recubrimientos poliméricos de naturaleza apolar y polar, PDMS y PA respectivamente.

#### IV.4.2.3.1- Extracción mediante PDMS

Los resultados obtenidos reflejados en la Tabla IV.4.2.3.-1, muestran las pérdidas de los componentes de mayor volatilidad. Así sucede con acetaldehído, etanol, 1-penten-3-ol, acetato de etilo y butirato de metilo que son, a su vez, responsables del aroma fresco del zumo de naranja (Arctander, 1969).

*Aldehídos.*- Durante el proceso de desaireación del zumo, dada la elevada volatilidad de la mayoría de los aldehídos, se observan pérdidas importantes a nivel cuantitativo, no siendo así a nivel cualitativo (con la excepción del acetaldehído).

Las mayores pérdidas, casi en su totalidad, se detectan en los aldehídos de volatilidad media: hexanal, octanal, nonanal, y citronelal. Distinto es el comportamiento de los aldehídos de mayor peso molecular, en los que las pérdidas son de menor cuantía, dada la baja volatilidad de los mismos. Otro hecho a destacar es la escasa presencia del furfural, considerado este como indicador de la degradación del zumo de naranja por tratamientos del mismo a elevadas temperaturas, sin duda más enérgicas que las aplicadas en esta desaireación.

Las pérdidas resultan ser superiores en el caso del estudio del espacio de cabeza mediante PDMS que en el estudio de los componentes volátiles totales anterior, lo que sin duda se asocia a las características que definen los métodos y a la importancia de los constituyentes de elevada volatilidad en el espacio de cabeza.

*Alcoholes.*- De igual forma que en los aldehídos destacamos la pérdida de componentes de elevada volatilidad, como etanol y 1-penten -3-ol. El resto de componentes, a nivel cuantitativo sufren una pérdida importante de su concentración, que oscila entre un 80 y un 90% para alcoholes de volatilidad media, (heptanol, octanol, linalol

y  $\alpha$ -terpineol) y un 50-80% para alcoholes de escasa volatilidad, presentando estos últimos un comportamiento similar al detectado en los aldehídos correspondientes.

*Hidrocarburos terpénicos.*- En este caso hemos de considerar la elevada afinidad del recubrimiento polimérico hacia estos compuestos, y en base a ello es posible explicar las diferencias de pérdidas determinadas a nivel cuantitativo de componentes volátiles totales y el espacio de cabeza mediante PDMS, ya que estos componentes presentan una volatilidad media y la afinidad hacia el hexano es elevada, presentando una buena recuperación en el sistema de SDE.

Así las pérdidas más elevadas corresponden a los terpenos de mayor volatilidad, superando en la totalidad de los componentes estudiados el 90% con relación al zumo refinado antes de su entrada al desaireador. Las mayores pérdidas son detectadas para sabineno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno y limoneno. Estos componentes corresponden a los de mayor concentración detectados en el zumo de naranja mediante PDMS. La sensibilidad del recubrimiento polimérico hacia estos componentes es fundamental y definen las enormes pérdidas determinadas, no siendo significativas para otros componentes de mayor volatilidad y polaridad.

Contrariamente cariofileno y  $\alpha$ -humuleno se comportan de distinto modo; en el estudio de la concentración de componentes volátiles totales, la desaireación del zumo no afecta en gran medida, pero se detectan las pérdidas en el espacio de cabeza como consecuencia de las características del recubrimiento polimérico expuestas con anterioridad.

Tabla IV.4.2.3.-1,- COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA DESAIREADO-DESACEITADO. HS-SPME (PDMS).

Componentes (mg/Kg)	Zumó Desaireado-Desaceitado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	17,269 ± 3,366	16,050 ± 6,158	30,928 ± 7,887
Metil-vinil-cetona	2,384 ± 3,372	N.D.	0,735 ± 1,039
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	1,579 ± 0,776	0,831 ± 0,002	1,856 ± 0,778
Valeraldehido+2 Pentanol	0,195 ± 0,053	0,147 ± 0,022	0,222 ± 0,126
Butirato de metilo	N.D.	0,002 ± 0,003	N.D.
3-metil-1-Butanol	N.D.	0,240 ± 0,339	0,162 ± 0,229
Hexanal+Butirato de etilo	0,053 ± 0,008	0,046 ± 0,011	0,027 ± 0,023
Furfural	N.D.	N.D.	4,325 ± 6,116
Trans-2-Hexenal	0,008 ± 0,012	0,015 ± 0,021	0,030 ± 0,043
Trans-2-Hexen 1-ol	1,014 ± 1,157	0,085 ± 0,121	0,254 ± 0,359
α-Pineno	0,442 ± 0,123	0,483 ± 0,027	0,569 ± 0,163
1-Heptanol	0,160 ± 0,004	0,285 ± 0,003	0,178 ± 0,178
Sabineno	0,046 ± 0,011	0,067 ± 0,029	0,139 ± 0,094
β-Pineno	0,035 ± 0,0007	0,003 ± 0,001	0,036 ± 0,051
Mirceno	0,465 ± 0,572	0,828 ± 0,138	0,916 ± 0,311
Octanal	0,051 ± 0,005	0,009 ± 0,005	0,006 ± 0,009
α-Felandreno	0,206 ± 0,030	0,284 ± 0,090	0,338 ± 0,137
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,090 ± 0,005	0,040 ± 0,018	0,011 ± 0,001
α-Terpineno	0,991 ± 0,108	1,090 ± 0,185	0,963 ± 0,088

<b>Limoneno</b>	33,893 ± 5,024	37,004 ± 5,051	32,595 ± 0,657
<b>γ-Terpineno</b>	0,441 ± 0,052	0,509 ± 0,094	0,452 ± 0,041
<b>Octanol</b>	0,323 ± 0	0,432 ± 0,033	0,482 ± 0,087
<b>Linalol</b>	0,972 ± 0,011	0,065 ± 0,026	0,800 ± 0,310
<b>Nonanal</b>	0,019 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,018 ± 0,036
<b>Citronelal</b>	0,003 ± 0,0002	0,005 ± 0	0,005 ± 0,0007
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,454 ± 0,013	0,722 ± 0,161	0,581 ± 0,297
<b>α-Terpineol</b>	0,723 ± 0,043	1,393 ± 0,084	1,240 ± 0,551
<b>Decanal</b>	0,075 ± 0,0007	0,032 ± 0,037	0,086 ± 0,0001
<b>Acetato de octilo</b>	0,002 ± 0,0001	0,006 ± 0,0002	0,006 ± 0,0003
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,099 ± 0,004	0,079 ± 0,104	0,143 ± 0,015
<b>Carveol</b>	0,015 ± 0,022	0,034 ± 0,012	0,018 ± 0,025
<b>Neral</b>	0,002 ± 0,0007	0,041 ± 0,008	0,002 ± 0,0007
<b>Carvona</b>	0,060 ± 0,013	0,058 ± 0,016	0,033 ± 0,036
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,095 ± 0,015	0,075 ± 0,056	0,128 ± 0,002
<b>Geranial</b>	0,016 ± 0,0008	0,022 ± 0,016	0,070 ± 0,035
<b>Perialdehido</b>	0,025 ± 0,013	0,011 ± 0,014	0,014 ± 0,005
<b>Undecanal</b>	0,005 ± 0,0002	tr	0,007 ± 0,001
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,003 ± 0,0003	0,007 ± 0,004	0,076 ± 0,093
<b>Acet. nerilo</b>	0,006 ± 0,0002	0,475 ± 0,664	0,010 ± 0,001
<b>Acet. geranilo</b>	0,005 ± 0,0001	0,020 ± 0,021	0,010 ± 0,002
<b>Dodecanal</b>	0,0312 ± 0,001	0,028 ± 0,004	0,046 ± 0,004
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	0,173 ± 0,084	0,200 ± 0,220
<b>Cariofileno</b>	0,008 ± 0,001	0,001 ± 0,002	0,018 ± 0,019
<b>α-Humuleno</b>	0,004 ± 0,001	0,008 ± 0,003	0,014 ± 0,004
<b>Dodecanol</b>	0,016 ± 0,001	0,014 ± 0,020	0,011 ± 0,009
<b>Valenceno</b>	0,300 ± 0,036	0,493 ± 0,142	1,496 ± 1,625

*Ésteres y Cetonas.*- El comportamiento detectado en estos componentes es bastante dispar. En relación a compuestos cetónicos se determina una ligera disminución en la concentración, próxima a la detectada en el análisis de componentes volátiles totales.

Los ésteres con la excepción de acetato de etilo y butirato de metilo, que no son detectados en el espacio de cabeza del zumo desaireado, tienen un comportamiento opuesto al descrito en el estudio de componentes volátiles totales. Como consecuencia de la mayor concentración detectada en el caso de acetato de nerilo y la modificación casi inapreciable de la concentración de acetato de terpenilo y antranilato de etilo. Esto podría explicarse considerando la mecánica de adsorción de PDMS, recubrimiento específico de componentes apolares en los que la disminución de la concentración de terpenos aumenta la capacidad del recubrimiento por retener otros componentes de menor polaridad.

#### IV.4.2.3.2.- *Extracción mediante PA*

Los resultados del estudio de la fracción volátil en espacio de cabeza del zumo desaireado mediante PA quedan expuestos en la Tabla IV.4.2.3.-2.

El comportamiento generalizado muestra una disminución importante en el contenido de componentes volátiles, no llegándose a detectar acetaldehído, etanol, 1-butanol, acetato de etilo y butirato de metilo, al igual que en el análisis mediante PDMS. A estos componentes se les suma la no detección de neral y metil-vinil-cetona. Dada la especificidad del PA hacia componentes de elevada polaridad, no se aprecia el efecto del desaireado del zumo para determinados componentes de polaridad y volatilidad bajas; así sucede con  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno, valenceno, geraniol, dodecanol y acetato de terpenilo.



*Aldehídos.*- En el espacio de cabeza del zumo desaireado no se observan diferencias a nivel cualitativo entre los aldehídos detectados con el empleo de ambos recubrimientos poliméricos.

Un comportamiento generalizado de los aldehídos, dada la mayor afinidad hacia la fibra polar, es la mayor adsorción de los mismos quedando esta bastante favorecida, lo que se traduce en la detección de menores pérdidas de concentración por la desaireación del zumo en relación a las cantidades detectadas con PDMS. Con excepción del neral, que no llega a ser detectado en el zumo desaireado.

Los aldehídos que sufren mayores pérdidas son hexanal, citronelal, geranial y undecanal, llegando a superar el 80% de pérdida de concentración en relación al zumo antes de ser desaireado. El resto de componentes son recuperados por la fibra en mayor proporción; esta capacidad de adsorción del recubrimiento polimérico sobre determinados componentes depende en gran medida de las características del propio constituyente, los coeficientes de reparto entre las distintas etapas que conforman el sistema y el tiempo que la fibra es mantenida en el espacio de cabeza de la muestra.

En relación a todas estas características, puede ocurrir que el intervalo estimado como tiempo de equilibrio para algunos de los componentes coincida con el punto de cambio, tiempo en el que comienza la ralentización de la retención de componentes volátiles por parte de la fibra, lo que se traduce en una disminución de la concentración detectada no coincidente con la realidad del proceso.

*Alcoholes.*- El efecto de la desaireación del zumo sobre los alcoholes detectados mediante PA se traduce en la no detección de etanol y 1-butanol, al igual que sucedía con la fibra de PDMS. El resto

Tabla IV.4.2.3.-2.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN ZUMO DE NARANJA DESAIREADO-DESACEITADO. HS-SPME (PA).**

Componentes (mg/Kg)	Zumó Desaireado-Desaceitado		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	99,108 ± 42,413	178,421 ± 31,804	117,647 ± 7,740
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	0,777 ± 0,848
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	0,460 ± 0,131	0,647 ± 0,759	0,270 ± 0,217
Valeraldehido+2 Pentanol	N.D.	0,1 ± 0,141	0,134 ± 0,189
Butirato de metilo	N.D.	N.D.	0,019 ± 0,026
3-metil-1-Butanol	0,057 ± 0,014	0,303 ± 0,002	0,204 ± 0,018
Hexanal+Butirato de etilo	0,050 ± 0,001	0,058 ± 0,038	0,051 ± 0,025
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,036 ± 0,004	0,070 ± 0,055	0,145 ± 0,137
Trans-2-Hexen 1-ol	0,096 ± 0,015	0,153 ± 0,090	0,25 ± 0,202
α-Pineno	0,245 ± 0,074	0,341 ± 0,082	0,376 ± 0,142
1-Heptanol	0,008 ± 0,0008	0,023 ± 0,013	0,025 ± 0,011
Sabineno	0,015 ± 0,005	0,040 ± 0,039	0,317 ± 0,297
β-Pineno	0,035 ± 0,007	0,032 ± 0,039	0,052 ± 0,022
Mirceno	0,669 ± 0,211	0,921 ± 0,299	0,930 ± 0,289
Octanal	0,070 ± 0,005	0,022 ± 0,005	0,049 ± 0,026
α-Felandreno	0,021 ± 0,004	0,230 ± 0,030	0,112 ± 0,137
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,071 ± 0,0007	0,052 ± 0,007	0,050 ± 0,019
α-Terpineno	0,067 ± 0,016	0,176 ± 0,051	0,188 ± 0,036

<b>Limoneno</b>	31,675 ± 8,005	40,036 ± 10,120	40,501 ± 8,662
<b>γ-Terpineno</b>	0,057 ± 0,012	0,125 ± 0,031	0,124 ± 0,004
<b>Octanol</b>	0,217 ± 0,009	0,332 ± 0,092	0,356 ± 0,074
<b>Linalol</b>	0,331 ± 0,007	0,331 ± 0,038	0,270 ± 0,06
<b>Nonanal</b>	0,049 ± 0,001	0,041 ± 0,004	0,035 ± 0,01
<b>Citronelal</b>	0,003 ± 0,0002	0,005 ± 0,0004	0,004 ± 0
<b>Terpinen-4-ol</b>	0,310 ± 0,001	0,506 ± 0,072	0,413 ± 0,174
<b>α-Terpineol</b>	0,345 ± 0,005	0,684 ± 0,026	0,624 ± 0,272
<b>Decanal</b>	0,162 ± 0,007	0,172 ± 0,029	0,179 ± 0,031
<b>Acetato de octilo</b>	0,003 ± 0,004	0,006 ± 0,009	0,013 ± 0
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,061 ± 0,003	0,098 ± 0,019	0,104 ± 0,017
<b>Carveol</b>	0,041 ± 0,058	N.D.	0,061 ± 0,013
<b>Neral</b>	0,001 ± 0,002	tr	0,001 ± 0,001
<b>Carvona</b>	0,074 ± 0,016	0,087 ± 0,026	0,084 ± 0,013
<b>Geraniol+Acetato de linalilo</b>	0,081 ± 0,008	0,102 ± 0,039	0,512 ± 0,702
<b>Geranial</b>	0,021 ± 0,007	0,042 ± 0,012	0,035 ± 0,038
<b>Perialdehido</b>	0,045 ± 0,008	0,035 ± 0,002	0,033 ± 0,026
<b>Undecanal</b>	0,007 ± 0,005	0,013 ± 0,006	0,010 ± 0,001
<b>Acet.terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,003 ± 0,001	0,006 ± 0,0005	0,011 ± 0,003
<b>Acet. nerilo</b>	0,006 ± 0,0001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001
<b>Acet. geranilo</b>	0,005 ± 0,0003	0,007 ± 0,002	0,009 ± 0,003
<b>Dodecanal</b>	0,041 ± 0,001	0,036 ± 0,002	0,050 ± 0,011
<b>Antranilato de etilo</b>	0,004 ± 0,005	N.D.	0,123 ± 0,174
<b>Cariofileno</b>	0,006 ± 0,004	0,015 ± 0,002	0,018 ± 0,026
<b>α-Humuleno</b>	0,005 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,019 ± 0,003
<b>Dodecanol</b>	0,011 ± 0,002	0,008 ± 0,011	0,051 ± 0,054
<b>Valenceno</b>	0,337 ± 0,06	0,671 ± 0,281	1,710 ± 1,721

de componentes de volatilidad media sufren pérdidas de concentración que oscilan entre el 60 y el 75% de su concentración inicial, con excepción de 3-metil-1-butanol y 1-heptanol, que no superan el 30% de pérdidas. Alcoholes de menor volatilidad y polaridad, caso de geraniol y dodecanol no sufren modificaciones de concentración tras la desaireación del zumo según lo detectado mediante PA. Lo contrario que sucede con la extracción con PDMS.

*Hidrocarburos terpénicos.*- Estos componentes, en su detección mediante recubrimiento polar, denotan menos modificaciones de concentración, como consecuencia de la escasa afinidad de los mismos hacia la fibra. Así,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno y valenceno, no presentan modificaciones de concentración tras la etapa de desaireación del zumo, frente a las elevadas pérdidas detectadas por los mismos con el empleo de PDMS. En la determinación de componentes volátiles totales los resultados obtenidos para los terpenos son más próximos a los encontrados con PA, a excepción de los componentes que no modifican su concentración.

*Ésteres y Cetonas.*- Las cetonas de elevada volatilidad detectadas mediante PA no sufren apenas modificaciones de concentración tras la etapa de desaireación. Este hecho únicamente se explica atendiendo a lo anteriormente expuesto del comportamiento de la fibra en la adsorción de componentes volátiles.

Los ésteres de elevada volatilidad como acetato de etilo y butirato de metilo no son detectados, al igual que con el empleo de PDMS. El resto de componentes analizados presentan un comportamiento similar a lo detectado mediante el análisis de componentes volátiles totales, lo que puede traducirse en una buena adecuación de la fibra hacia la detección de ésteres en el espacio de cabeza de disoluciones acuosas.

## IV.4.2.4.- Análisis estadístico

El efecto de la desaireación sobre los componentes volátiles en espacio de cabeza también se ha determinado considerando las diferencias significativas existentes entre las concentraciones de los diferentes componentes a la entrada y salida del desaireador.

Los resultados de estas relaciones en el análisis de componentes volátiles mediante el empleo de PDMS aparecen en la Tabla IV.4.2.4.-1.

Tabla IV.4.2.4.-1.- **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO (10-15% S.I.)-ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO. HS-SPME (PDMS).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ÉSTERES	CETONAS
<b>REFINADO</b>	4,93 ± 3,15 <sup>a</sup>	22,45 ± 7,47 <sup>a</sup>	609,7 ± 156,4 <sup>a</sup>	1,32 ± 1,28 <sup>a</sup>	31,83 ± 14,44 <sup>a</sup>
<b>DESAIREADO</b>	0,41 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,77 ± 0,56 <sup>b</sup>	38,43 ± 4,11 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,41 <sup>a</sup>	23,93 ± 9,26 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

Las medias obtenidas, demuestran que la desaireación del zumo lleva asociada una pérdida importante de constituyentes volátiles, dándose la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones detectadas para aldehídos, alcoholes y terpenos, pero que no lo son en el caso de cetonas y ésteres. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en el caso del análisis de componentes volátiles totales, quedando más reflejado este hecho en el estudio de la composición del espacio de cabeza en el zumo desaireado mediante PDMS.

El análisis estadístico aplicado al estudio del efecto de la desaireación sobre la composición aromática del zumo, mediante el empleo de PA como recubrimiento polimérico, muestra los resultados de la Tabla IV.4.2.4.-2.

**Tabla IV.4.2.4.-2.-. ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO (10-15% S.I.)-ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO. HS-SPME (PA).**

	<b>ALDEHIDOS</b>	<b>ALCOHOLES</b>	<b>H.TERPÉNICOS</b>	<b>ESTERES</b>	<b>CETONAS</b>
<b>REFINADO</b>	2,08 ± 0,85 <sup>a</sup>	10,18 ± 11,48 <sup>a</sup>	88,61 ± 17,41 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,79 <sup>a</sup>	245,40 ± 137,20 <sup>a</sup>
<b>DESAIREAD</b>	1,21 ± 1,04 <sup>a</sup>	7,23 ± 14,34 <sup>a</sup>	42,98 ± 13,54 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,54 <sup>a</sup>	123,30 ± 44,66 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Los resultados obtenidos muestran la existencia de diferencias estadísticamente significativas únicamente en el caso de terpenos.

Con el empleo de ambos recubrimientos poliméricos detectamos pérdidas marcadas en la concentración de componentes volátiles, pero atendiendo a los resultados obtenidos podríamos deducir que estadísticamente estas pérdidas quedan mucho más definidas con el empleo de PDMS.

Para explicar mejor este hecho se realiza un análisis estadístico de las diferencias encontradas en la determinación de constituyentes volátiles con el empleo de ambos recubrimientos sobre un mismo sustrato. El estudio comparado de la adsorción de componentes volátiles en espacio de cabeza mediante el empleo de los dos recubrimientos poliméricos, nos informará a cerca de la idoneidad de cada una de estos en la determinación de componentes volátiles del

zumo desaireado. Los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla IV.4.2.4.-3.

Tabla IV.4.2.4-3.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE PDMS-PA EN ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>PDMS</b>	0,41 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,56 <sup>a</sup>	38,43 ± 4,11 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,41 <sup>a</sup>	23,93 ± 9,26 <sup>a</sup>
<b>PA</b>	1,21 ± 1,04 <sup>a</sup>	7,26 ± 14,34 <sup>a</sup>	42,98 ± 13,54 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,54 <sup>a</sup>	132,30 ± 44,16 <sup>b</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Los resultados estadísticos referentes a las diferencias en las concentraciones medias de los constituyentes entre el zumo refinado y el desaireado mostraban la mejor adecuación de PDMS frente al PA. Sin embargo, el estudio comparado de la capacidad de adsorción de cada uno de estos recubrimientos sobre el zumo desaireado, muestra una mejor adecuación del PA, ya que los valores absolutos de las concentraciones superan a los detectados mediante PDMS. Este dato contrasta con la no detección de diferencias estadísticamente significativas en el empleo de ambos recubrimientos; excepto en el caso de cetonas, el problema se asocia a la detección con PA de la acetona, como ha sido comentado en apartados anteriores.

Estos datos definen la mejor adecuación del PA en la detección de componentes polares en muestras polares cuando el contenido en componentes apolares no es elevado, tal como expresan Steffen y Pawliszyn en 1996.

#### IV.4.3.- Efecto de la pasteurización

La pasteurización es una operación esencial para conseguir una conservación de larga vida en el zumo de naranja. Con la pasteurización se consigue la destrucción de microorganismos y, lo que es más importante en los zumos de naranja, la inactivación de enzimas a base de calentar el producto a temperaturas de hasta 95°C durante periodos en torno a los 30 segundos. Este proceso corresponde con la última etapa de la industrialización del zumo simple que contemplamos en esta memoria de Tesis; en ella el zumo se somete a elevadas temperaturas, que indudablemente han de afectar a la composición del zumo y especialmente a la fracción aromática.

Por ello, en este apartado analizamos el efecto de la pasteurización sobre la fracción aromática del zumo, realizando un estudio comparado entre los constituyentes volátiles totales y en espacio de cabeza respecto a los del zumo desaireado.

##### IV.4.3.1.- Componentes volátiles. SDE

El análisis de la fracción aromática total del zumo pasteurizado, como en los casos anteriores, se realiza con la técnica de SDE. Atendiendo a las limitaciones del método definidas con anterioridad, los resultados obtenidos quedan reflejados en la Tabla IV.3.1.-2., recogida anteriormente.

A nivel cualitativo encontramos diferencias mínimas en composición entre el zumo desaireado y el zumo pasteurizado, ya que únicamente se observa la no detección de 1-heptanol y  $\alpha$ -felandreno en el zumo pasteurizado. A nivel cuantitativo, encontramos que las pérdidas en las concentraciones de los componentes en la mayoría de los casos son inapreciables.



La eliminación previa de la mayor parte de los componentes volátiles en la operación conjunta de desaireado-desaceitado limita la extensión del daño térmico de la pasteurización en el zumo así elaborado.

*Aldehídos.*- Los aldehídos, muestran mayores pérdidas en los componentes de mayor volatilidad, pero no superan en ninguno de los casos el 50% con relación a la concentración a la salida del desaireador; tal es el caso de valeraldehído y hexanal. En el resto de componentes analizados las pérdidas pueden ser consideradas inapreciables.

Por tanto, se puede afirmar que la pasteurización prácticamente no afecta a las concentraciones de los aldehídos: no se detectan la aparición de aldehídos cuya presencia indica tratamientos térmicos abusivos del zumo como furfural, considerado como indicador de la calidad en zumos (Lee y Nagy, 1996).

*Alcoholes.*- Los alcoholes tampoco quedan afectados durante la etapa de pasteurización. El estudio comparado de las concentraciones detectadas en el zumo desaireado y el zumo a la salida del pasteurizador no denotan cambios significativos tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

Al igual que para los aldehídos tampoco se detecta el aumento de concentración de componentes relacionados con el desarrollo de olores desagradables (“off-flavours”) en el zumo por efecto de la temperatura. En el zumo de naranja el más característico de todos es  $\alpha$ -terpineol, considerado por Slater y Watkins (1964) como indicador de un tratamiento térmico elevado durante el procesado industrial. En nuestro estudio este componente no modifica apenas su concentración tras la pasteurización del zumo.

De estos resultados se deduce que la pasteurización no modifica el contenido en alcoholes de los componentes volátiles totales

estudiados. Las variaciones en concentración de estos componentes ocurren en mayor medida en la etapa del desaireado.

*Hidrocarburos terpénicos:* Estos componentes terpénicos, al igual que en los casos anteriores, no sufren pérdidas de concentración por pasteurización del zumo respecto al zumo desaireado.

*Ésteres y Cetonas.-* Los ésteres tampoco sufren cambios importantes en su concentración, y en relación a las cetonas detectadas, destaca la disminución de etil-vinil-cetona y el aumento en concentración de carvona, considerado como derivada de la oxidación del d-limoneno (Moshonas y Shaw, 1990).

#### IV.4.3.2.- *Análisis estadístico*

El análisis de varianza simple entre las concentraciones de los componentes volátiles totales detectados en el zumo desaireado y el zumo pasteurizado (Tabla IV.4.3.2.-1), muestra la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambas modalidades de zumo. Estos resultados refuerzan lo expresado anteriormente, por lo cual podemos deducir que, en nuestra experiencia, la etapa de pasteurización no afecta al contenido en componentes volátiles totales determinados mediante SDE del zumo desaireado-desaceitado.

Tabla IV.4.3.2.-1-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO-ZUMO PASTEURIZADO.**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>DESAIREADO</b>	2,40 ± 1,12 <sup>a</sup>	4,94 ± 2,15 <sup>a</sup>	196,90 ± 114,2 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,14 ± 1,03 <sup>a</sup>
<b>PASTEURIZADO</b>	1,75 ± 1,07 <sup>a</sup>	4,74 ± 1,41 <sup>a</sup>	190,7 ± 72,14 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,79 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

#### IV.4.3.3.- Componentes volátiles. HS-SPME

El análisis del efecto de la pasteurización sobre los componentes volátiles en espacio de cabeza del zumo desaireado no muestra grandes variaciones como consecuencia de la gran pérdida de componentes de elevada volatilidad sufrida en la desaireación-desaceitado del zumo.

##### IV.4.3.3.1- Extracción mediante PDMS

El análisis de los componentes volátiles en el espacio de cabeza del zumo pasteurizado y del zumo desaireado mediante PDMS se recoge en las Tablas IV.3.2.2.-1 y IV.4.2.3.-1. Los resultados obtenidos muestran la escasa incidencia de la pasteurización sobre la composición cualitativa y cuantitativa de los constituyentes volátiles, destacando que no se detectan 3-metil-1-butanol, trans-2-hexenal y trans-2-hexenol en el espacio de cabeza del zumo ya pasteurizado.

El resto de componentes apenas sufren modificaciones en su concentración, por lo que no realizamos el estudio detallado de los constituyentes, sino que establecemos un visión general de los mismos.

Destaca que la adsorción de componentes tales como hexanal, octanal, nonanal,  $\beta$ -pineno, linalol, dodecanol y cariofileno, queda favorecida tras la pasteurización del zumo, en el recubrimiento polimérico; frente a geranial,  $\Delta_3$ -careno, acetato de terpenilo y antranilato de etilo en los que se detecta una disminución importante de sus concentraciones.

#### IV.4.3.3.2.- *Extracción mediante PA*

Dada la escasa incidencia de la pasteurización sobre los componentes volátiles del zumo desaireado, el análisis de los mismos mediante PA (Tablas IV.3.2.2.-3 y IV.4.2.3.-2) confirma lo anteriormente detectado en el análisis de componentes volátiles totales y en espacio de cabeza mediante PDMS.

#### IV.4.3.4.- *Análisis estadístico*

##### IV.4.3.4.1.- *Empleo de PDMS*

El análisis estadístico de las concentraciones medias en ambas muestras de zumo nos confirma estas afirmaciones, tal como queda reflejado en la Tabla IV.4.3.4.-1.

Estos resultados resaltan la escasa incidencia de la pasteurización sobre la fracción volátil en espacio de cabeza del zumo de naranja desaireado, en la cual no encontramos diferencias significativas entre los valores medios de las concentraciones de los distintos componentes, siendo a su vez los valores absolutos próximos entre sí.

Tabla IV.4.3.4.-1.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO-ZUMO PASTEURIZADO. HS-SPME (PDMS).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>DESAIREADO</b>	0,41 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,56 <sup>a</sup>	38,43 ± 4,11 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,40 <sup>a</sup>	23,93 ± 9,26 <sup>a</sup>
<b>PASTEURIZADO</b>	0,58 ± 0,38 <sup>a</sup>	3,37 ± 0,25 <sup>a</sup>	37,83 ± 12,39 <sup>a</sup>	1,14 ± 1,65 <sup>a</sup>	25,24 ± 9,74 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

#### IV.4.3.4.2.- Empleo de PA

El estudio estadístico de los datos obtenidos en la extracción mediante PA, refleja de igual forma que no existen diferencias significativas entre los valores medios de las concentraciones detectadas. Estos resultados aparecen en la Tabla IV.4.3.4.-2.

Aunque a nivel de valores absolutos, con el empleo de PA como recubrimiento se observa la disminución de las concentraciones de aldehídos, alcoholes, hidrocarburos terpénicos y ésteres, lo que no sucede para las cetonas. De nuevo se deduce la importancia de la naturaleza del recubrimiento polimérico y de la matriz acuosa sobre la valoración de componentes volátiles en zumo de naranja.

Tabla IV.4.3.4.-2.- **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO DESAIREADO-DESACEITADO-ZUMO PASTEURIZADO. HS-SPME (PA).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>DESAIREA.</b>	1,21 ± 1,04 <sup>a</sup>	7,23 ± 14,34 <sup>a</sup>	42,98 ± 13,54 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,54 <sup>a</sup>	132,30 ± 44,16 <sup>a</sup>
<b>PASTEURIZ.</b>	0,71 ± 0,32 <sup>a</sup>	2,66 ± 3,04 <sup>a</sup>	38,02 ± 5,89 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,14 <sup>a</sup>	226,90 ± 110,40 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Terminamos el estudio con una visión global del efecto del procesado, para ello realizamos una valoración comparada de la fracción aromática en el zumo de naranja en las primeras etapas del procesado y el producto final.

#### IV.4.4.- Efecto global del procesado industrial sobre los componentes volátiles. Zumo refinado-zumo pasteurizado.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los apartados anteriores, el zumo durante el procesado sufre una serie de cambios que indudablemente causan una modificación de su aroma original. El estudio comparado de las concentraciones de los constituyentes volátiles en el zumo ya refinado, considerado este como un zumo recién exprimido por la industria, de características homogéneas, y el producto acabado ó zumo pasteurizado bebible, nos informa acerca del efecto global del procesado industrial sobre los constituyentes volátiles totales y en espacio de cabeza del zumo de naranja.

Considerando el hecho de que la pasteurización apenas si modifica la composición cualitativa y cuantitativa de la fracción aromática del zumo desaireado, el estudio comparado de la composición aromática entre el zumo refinado y el pasteurizado es

bastante próximo al anteriormente descrito entre el zumo refinado y el zumo desaireado.

Por este motivo, en este apartado nos limitamos al estudio estadístico de las diferencias significativas existentes en el contenido de componentes volátiles entre las tres etapas definitorias del procesado industrial, considerando, el zumo refinado, el zumo desaireado y el zumo pasteurizado.

#### *IV.4.4.1.- Componentes volátiles. SDE*

Las anteriores Tablas IV.4.1.1.-1 y IV.3.1.-2 recogían la composición cualitativa y cuantitativa de los componentes volátiles totales en zumo de naranja refinado y zumo pasteurizado, respectivamente.

El análisis estadístico de las concentraciones de los componentes agrupados en base a su naturaleza química (Tabla IV.4.4.1.-1.) muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos de aldehídos, alcoholes y terpenos, pero no ocurre así en el caso de ésteres y cetonas.

No existen diferencias estadísticamente significativas entre ésteres y cetonas, lo que se debe a la variabilidad del método en la determinación cuantitativa de estos componentes, ya que se detectan claramente diferencias importantes en los valores medios absolutos de los mismos.

Las diferencias significativas encontradas en el contenido de los aldehídos se deben en gran parte a los componentes mayoritarios presentes en el zumo refinado: decanal, octanal y valeraldehído, procedentes de la incorporación de aceite esencial de la corteza de naranja durante el exprimido. Estos componentes experimentan pérdidas importantes de concentración; así por ejemplo el decanal presente en el zumo refinado en una concentración que oscila entre

2,27 y 2,79 ppm, es detectado en el zumo pasteurizado a niveles de 0,33 y 0,88 ppm.

Tabla. IV.4.4.1-1-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO-ZUMO DESAIREADO-ZUMO PASTEURIZADO.**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>REFINADO</b>	7,33 ± 5,41 <sup>a</sup>	18,63 ± 8,24 <sup>a</sup>	747,90 ± 456,20 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,54 <sup>a</sup>	1,52 ± 1,46 <sup>a</sup>
<b>DESAIREADO</b>	2,40 ± 1,12 <sup>b</sup>	4,94 ± 2,15 <sup>b</sup>	196,90 ± 114,20 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,14 <sup>a</sup>	1,14 ± 1,03 <sup>a</sup>
<b>PASTEURIZADO</b>	1,75 ± 1,07 <sup>b</sup>	4,74 ± 1,41 <sup>b</sup>	190,7 ± 72,14 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,79 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Octanal y decanal son considerados como componentes bastante influyentes en la calidad del aroma de la naranja por autores como Arctander (1969) y Boelens y van Gemert (1987). Sin embargo, Ahmed *et al.* (1978a) encuentran que concentraciones de decanal superiores a 0,72 ppm influyen de forma negativa en la calidad organoléptica del zumo. Con lo cual podríamos deducir que con este procesado industrial se favorece la disminución de la concentración de estos componentes, mejorando en este sentido la calidad del aroma del zumo de naranja y su conservación.

Con relación a los alcoholes mayoritarios detectados en el zumo de naranja refinado: octanol, linalol, terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol, procedentes de la incorporación de aceite esencial, tienen pérdidas bastante significativas. En concreto,  $\alpha$ -terpineol -que procede de la degradación del limoneno- es considerado por autores como Tatum *et al.* (1975) un índice de la pérdida de calidad del aroma del zumo, y su



presencia comienza a ser problemática en niveles superiores a 2ppm. En nuestro estudio el contenido en este componente varía entre 2,35-4ppm en el zumo refinado hasta 0,5 y 1ppm en el zumo pasteurizado, que supone una disminución importante, quedando la concentración presente en el producto acabado en un nivel inferior al establecido por estos autores.

El contenido en hidrocarburos terpénicos también sufre una disminución importante durante el procesado industrial. Los componentes mayoritarios detectados en el zumo refinado son limoneno, mirceno,  $\alpha$ -pineno y valenceno. Estos componentes no están presentes en la fracción aromática del zumo, sino que proceden de la incorporación de aceite esencial durante la extracción. El  $\alpha$ -pineno es considerado por autores como Ahmed *et al.* (1978a), como un importante factor de la calidad de la fracción aromática del zumo de naranja. En nuestro estudio encontramos pérdidas del contenido en este componente, ya que la concentración detectada en el mismo oscila entre 3 y 2 ppm en el zumo refinado y 1 y 0,05 ppm en el pasteurizado.

Esteres y cetonas, -componentes caracterizados por conferir calidad a la fracción aromática del zumo- como acetato de etilo, y butiratos de etilo y metilo, según lo establecido por Nísperos-Carriedo y Shaw en 1990, son considerados también como índices de calidad en la fracción aromática del zumo, destacando que una disminución del contenido supone un empobrecimiento de la calidad del mismo. En nuestro estudio únicamente podemos referirnos a butirato de etilo y de metilo como consecuencia de la no detección del acetato de etilo mediante SDE; destaca una pérdida importante en estos componentes en el zumo de naranja pasteurizado. Butirato de etilo asociado en la detección con el hexanal, experimenta pérdidas desde 0,5 ppm en el zumo refinado a 0,07 ppm en el pasteurizado, además de la casi

desaparición de butirato de metilo, que sólo se detecta en las muestras correspondientes al mes de abril y a una concentración de 0,04 ppm frente a las 0,4 ppm detectadas en el zumo refinado en las muestras correspondientes al mes de enero.

Las cetonas detectadas han sido etil-vinil-cetona, de elevada volatilidad, y carvona, considerada esta última como agente indicador de la degradación del zumo pues procede de la hidrólisis ácida del limoneno (Moshonas y Shaw, 1990). Destacamos el efecto de la disminución del contenido en carvona, lo que supondría en este caso un aumento de la calidad de la fracción aromática del zumo, además de indicarnos que el procesado industrial no induce hacia la formación de productos de degradación de otros componentes.

Del análisis de componentes volátiles totales mediante SDE, se deduce que el efecto del procesado industrial utilizado en este trabajo – ya que no se recuperan componentes de elevada volatilidad-, resulta favorable como consecuencia de la reducción de los niveles de determinados componentes que a elevadas concentraciones suponen el desarrollo de aromas desagradables.

#### IV.4.4.2.- *Componentes volátiles. HS-SPME*

Como ha sido detallado en los apartados anteriores el estudio de la fracción volátil en espacio de cabeza es más significativa de la evolución de los constituyentes volátiles durante el procesado industrial, dada la mayor capacidad de detección del método.

## IV.4.4.2.1- Extracción mediante PDMS

El análisis del efecto del procesado sobre los componentes volátiles considerando PDMS como recubrimiento polimérico, muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de aldehídos, alcoholes y terpenos, no siendo así entre ésteres y cetonas. Estos resultados quedan reflejados en la Tabla IV.4.4.2.-1.

Tabla. IV.4.4.2.-1. ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO-ZUMO DESAIREADO-ZUMO PASTEURIZADO.HS-SPME (PDMS).

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>REFINADO</b>	4,92 ± 3,14 <sup>a</sup>	22,45 ± 7,47 <sup>a</sup>	609,7 ± 156,4 <sup>a</sup>	1,32 ± 1,28 <sup>a</sup>	31,83 ± 14,44 <sup>a</sup>
<b>DESAIREADO</b>	0,41 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,77 ± 0,56 <sup>b</sup>	38,43 ± 4,11 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,41 <sup>a</sup>	23,93 ± 9,26 <sup>a</sup>
<b>PASTEURIZADO</b>	0,58 ± 0,38 <sup>b</sup>	3,37 ± 0,25 <sup>b</sup>	37,83 ± 12,39 <sup>b</sup>	1,14 ± 1,65 <sup>a</sup>	25,24 ± 9,74 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

El estudio comparado de las concentraciones detectadas en los productos al inicio y al final del procesado, muestra a nivel de componentes individuales pérdidas importantes, no siendo detectados acetaldehído, furfural, trans-2-hexenal, etanol, 1-penten-3-ol, 3-metil-1-butanol, trans-2-hexen-1-ol, metil-vinil-cetona, acetato de etilo y butirato de metilo. Estos componentes son solubles en agua y considerados como importantes contribuyentes al aroma fresco de la naranja (Shaw, 1991).

Todos los compuestos identificados en este estudio han sido anteriormente identificados como constituyentes del zumo de naranja y

del aceite esencial por Maarse y Visscher en 1989, aunque para muchos de estos compuestos su contribución al aroma del zumo de naranja no ha sido definida. Alguna indicación de la contribución de estos componentes a nivel individual puede ser llevada a cabo por comparación del umbral de detección de los mismos en aire o en agua con la cantidad presente en el zumo de naranja (Moshonas y Shaw, 1994).

Con relación a los aldehídos, los detectados en mayor concentración en el espacio de cabeza del zumo refinado corresponden a octanal, decanal y hexanal, considerados por Shaw (1991) como importantes contribuidores en el aroma del zumo de naranja, estos componentes sufren pérdidas importantes en su concentración en el procesado industrial. Así sucede con el decanal, componente que ha sido detectado en el zumo refinado en una concentración de 0,92 ppm y 0,2 ppm, frente a la cantidad detectada en el zumo pasteurizado que oscila entre 0,085 y 0,072 ppm. El umbral de detección olfatométrico de este componente en agua es de 0,002 ppm (Fazzalari, 1978) y 0,0049 ppm (Pino *et al.*, 1986), lo que explica su representación en la fracción aromática del zumo. La disminución detectada tras el procesado no supone una pérdida total de detección, pero si que merma la calidad del aroma del zumo de naranja.

Ahmed *et al.* (1978a) determinan, no obstante, que sólo concentraciones de decanal superiores a 0,72 ppm influyen de forma negativa en la calidad organoléptica del zumo. Según este mismo autor, trans-2-hexenal, componente no detectado en el zumo pasteurizado, presenta un nivel de detección de 0,0024 ppm, nonanal 0,0025 ppm, octanal 0,0014 ppm, citral 0,0085 y perialdehído 0,0030 ppm. Las concentraciones a que han sido detectados estos componentes en el zumo pasteurizado supera estos límites de detección olfatométrica, excepto en el caso del neral, componente cis del citral, para el que la concentración detectada no supera los límites de detección umbral determinados.

Los hidrocarburos terpénicos, componentes mayoritarios del aroma en la naranja, dada su menor volatilidad no son detectadas diferencias a nivel cualitativo. Limoneno,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -mirceno, son los terpenos detectados en mayor concentración en el zumo de naranja refinado; estos componentes han sido considerados por Shaw (1991) como importantes contribuyentes al aroma en la naranja.

Con excepción del limoneno, de ninguno de estos componentes se ha determinado los niveles óptimos a los que deben estar presentes en el zumo; no obstante, cantidades elevadas de estos componentes no están relacionadas con la calidad de los zumos de naranja (Moshonas y Shaw, 1994).

El nivel óptimo para el limoneno en zumo procesado oscila entre 150-220 ppm (Carter, 1990). Encontrándose su nivel umbral de detección en 0,06 ppm (Ahmed *et al.*, 1978b) y 0,229 ppm (Pino *et al.*, 1986). En nuestro estudio el contenido en limoneno en espacio de cabeza es de 35 ppm en el zumo ya pasteurizado.

Los alcoholes detectados en mayor concentración en el zumo refinado son etanol, octanol, linalol y  $\alpha$ -terpineol. Tras el procesado industrial su presencia disminuye en gran medida; en el caso del linalol, la concentración varía desde 6 ppm a 1ppm, siendo su límite de detección umbral de 0,0053 ppm (Ahmed *et al.*, 1978a) y de 0,0047 ppm (Pino *et al.*, 1986).

El etanol, componente no detectado mediante PDMS en el espacio de cabeza del zumo pasteurizado, presenta un límite de detección olfatométrico de 1150 ppm (Pino *et al.*, 1986), siendo la cantidad más elevada detectada en el zumo refinado de 6 ppm.

En relación a los ésteres acetato de etilo y butirato de metilo, no detectados en el espacio de cabeza del zumo pasteurizado, autores como Shaw (1991), declaran que están presentes en la mayoría de los zumos procesados por encima del nivel de detección umbral olfatométrico, dato no coincidente con nuestros resultados.

#### IV.4.4.2.2.- Extracción mediante PA

El análisis del efecto del procesado sobre los componentes en espacio de cabeza del zumo de naranja determinado mediante el recubrimiento de PA, muestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas únicamente entre aldehídos y terpenos, tal como se exponen en los resultados de la Tabla IV.4.4.2.-2.

Tabla. IV.4.4.2.-2.- **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO-ZUMO DESAIREADO-ZUMO PASTEURIZADO HS-SPME (PA).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>REFINADO</b>	2,08 ± 0,85 <sup>a</sup>	10,18 ± 11,48 <sup>a</sup>	88,61 ± 17,41 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,79 <sup>a</sup>	245,4 ± 137,2 <sup>a</sup>
<b>DESAIREADO</b>	1,20 ± 1,04 <sup>ab</sup>	7,23 ± 14,34 <sup>a</sup>	42,98 ± 13,54 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,54 <sup>a</sup>	132,3 ± 44,16 <sup>a</sup>
<b>PASTEURIZADO</b>	0,71 ± 0,32 <sup>b</sup>	2,67 ± 3,04 <sup>a</sup>	38,02 ± 5,89 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,14 <sup>a</sup>	226,9 ± 110,4 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

El comportamiento encontrado en los componentes volátiles determinados mediante este recubrimiento es similar al de PDMS. Se resalta que el nivel de sensibilidad en la detección de componentes de elevada polaridad y volatilidad en este recubrimiento resulta mucho más efectivo que con PDMS, con el que no se detectan en el espacio de cabeza del zumo pasteurizado: etanol, 3-metil-1-butanol, trans-2-hexen-1-ol, trans-2-hexenal y acetato de etilo, todos ellos componentes solubles en agua.

Steffen y Pawliszyn en 1996, comparan la capacidad de adsorción de ambos recubrimientos poliméricos, sobre 17 estándares de referencia característicos del zumo de naranja, encontrando una mayor capacidad de retención de PA para componentes de mayor volatilidad y polaridad. Este es el caso de butirato de etilo, butirato de metilo, octanal, linalol,  $\alpha$ -terpineol,..., frente a una mayor capacidad de retención de PDMS para los componentes térpenicos y decanal.

En nuestro trabajo estos resultados no son coincidentes pues lo expresado por estos autores no es extensible a todo tipo de muestras. Según los resultados obtenidos podemos afirmar que en muestras con elevado contenido en componentes de volatilidad alta y media (zumo refinado, p.ej.), la retención de los componentes de baja polaridad, como octanal, linanol,  $\alpha$ -terpineol,..., y los hidrocarburos terpénicos, es mucho más efectiva en PDMS que en PA; sin embargo, los componentes claramente solubles en agua, son retenidos mayoritariamente en el recubrimiento de PA, como consecuencia de la mayor constante de reparto existente entre esta fibra y los componentes de naturaleza polar.

Muestras con un contenido elevado en componentes de elevada volatilidad y menor presencia de componentes de volatilidad media, como sucede en el zumo con un contenido de sólidos insolubles inferior al 3%, ó en el zumo de naranja exprimido a mano, la capacidad de retención del PDMS supera la del PA en los componentes oxigenados solubles en aceite esencial, pero no para los componentes terpénicos, ya que no se detectan diferencias importantes a nivel cuantitativo en su determinación.

## **IV.5.- DISTRIBUCIÓN DE COMPONENTES VOLÁTILES ENTRE PULPA Y SUERO EN EL ZUMO DE NARANJA.**

Una de las etapas iniciales en el procesado industrial del zumo de naranja consiste, como hemos estudiado anteriormente, en la centrifugación del zumo refinado con el objeto de ajustar su contenido en pulpa. En la figura 1.2 del procesado se especifica esta etapa, en la que el zumo tras la centrifugación queda desdoblado en dos fracciones, una la pulpa fina y otra el zumo con un contenido en pulpa inferior al 3%, pudiendo ser este considerado a nivel técnico como suero.

En el apartado IV.4.1, se exponía como afecta la eliminación de la pulpa a la fracción aromática total y en espacio de cabeza del zumo de naranja refinado. En este apartado realizamos un estudio comparado de la fracción aromática presente en los dos productos obtenidos tras la centrifugación del zumo refinado con objeto de conocer el reparto existente entre la pulpa y el suero de los componentes volátiles presentes en el zumo de naranja.

### **IV.5.1.-Distribución de componentes volátiles. SDE**

Los resultados obtenidos de la destilación extracción simultánea del suero corresponden a los recogidos en la anterior Tabla IV.4.1.1.-3. y los relativos a la pulpa fina se reflejan en la Tabla IV.5.1.-1.

Con objeto de facilitar el conocimiento del reparto de componentes volátiles entre ambas fracciones, a continuación se esquematizan los resultados obtenidos en la Tabla IV.5.1.-2. La mayor o menor presencia de componentes en cada una de las fracciones se especifica mediante simbología con cruces.

En el estudio del reparto de los aldehídos detectados mediante SDE, destacamos la mayor afinidad de los de menor polaridad



(solubles en el aceite esencial de la naranja) hacia la pulpa fina. Así, nonanal, decanal, geranial, undecanal y dodecanal son detectados en mayor proporción en la pulpa fina. Componentes de mayor polaridad como valeraldehído, hexanal, octanal, neral y perialdehído, son detectados en concentraciones sólo ligeramente superiores (a nivel de valores absolutos) en el suero, en general bastante próximas a las detectadas en la pulpa fina, aunque con la excepción de perialdehído, ya que este componente es detectado mayoritariamente en el suero.

El reparto de los alcoholes muestra un mayor distribución de los mismos hacia la pulpa fina. Así, 1-heptanol, octanol,  $\alpha$ -terpineol, nerol + citronelol y geraniol están presentes en mayor proporción respecto a los niveles existentes en el suero. El resto de componentes alcohólicos, entre los que se encuentran 3-metil-1-butanol, linalol y terpinen-4-ol, son detectados en ambas muestras a niveles de concentración próximas entre sí.

Los componentes terpénicos dado su carácter de baja polaridad quedan prácticamente asociados a la pulpa y, por ello, en todos los casos se detectan concentraciones superiores en la pulpa fina.

En relación a ésteres y cetonas destacamos, de igual forma que sucede con los aldehídos, que los componentes de mayor polaridad quedan más asociados al suero. Tal es el caso de etil-vinil-cetona y butirato de metilo, pero el resto de componentes identificados presentan mayores concentraciones en la pulpa que en el suero, como acetato de terpenilo + acetato de citronelilo y acetatos de nerilo y de geranilo.

Tabla IV.5.1.-1.- **COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN LA PULPA FINA**

Componentes (mg/Kg)	Pulpa Fina		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	2,135 ± 0,880	0,731 ± 0,829	N.D.
Valeraldehido+2 Pentanol	1,582 ± 0,755	0,441 ± 0,763	0,018 ± 0,031
Butirato de metilo	0,020 ± 0,04	0,065 ± 0,077	0,006 ± 0,011
3-metil-1-Butanol	0,059 ± 0,118	0,082 ± 0,101	0,039 ± 0,068
Hexanal+Butirato de etilo	0,609 ± 0,289	0,442 ± 0,252	0,245 ± 0,215
Furfural	N.D.	0,001 ± 0,004	N.D.
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	4,524 ± 1,358	5,530 ± 1,764	N.D.
1-Heptanol	0,096 ± 0,076	0,008 ± 0,021	4,51 ± 2,916
Sabineno	3,160 ± 2,262	6,951 ± 2,879	3,799 ± 3,756
β-Pineno	0,419 ± 0,105	1,135 ± 0,914	0,512 ± 0,314
β-Mirceno	20,241 ± 6,204	24,297 ± 7,797	20,092 ± 12,692
Octanal	6,807 ± 2,567	1,379 ± 1,181	3,468 ± 5,125
α-Felandreno	0,075 ± 0,087	0,442 ± 0,237	0,139 ± 0,242
Δ <sub>3</sub> -Careno	1,737 ± 0,728	1,176 ± 0,373	1,124 ± 0,636
α-Terpineno	0,426 ± 0,140	0,523 ± 0,206	0,359 ± 0,259

<b>Limoneno</b>	1229,38 ± 355,78	1356,51 ± 362,88	1885,71 ± 186,58
<b>γ--Terpineno</b>	0,734 ± 0,237	1,498 ± 1,111	0,798 ± 0,475
<b>Octanol</b>	3,686 ± 2,004	6,243 ± 3,266	4,177 ± 2,703
<b>Linalol</b>	8,922 ± 4,394	7,582 ± 3,062	8,426 ± 5,308
<b>Nonanal</b>	1,164 ± 0,349	0,547 ± 0,317	0,632 ± 0,929
<b>Citronelal</b>	N.D.	0,009 ± 0,023	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	3,532 ± 1,642	3,700 ± 1,053	3,592 ± 3,066
<b>α-Terpineol</b>	1,414 ± 0,506	3,109 ± 1,268	5,731 ± 1,848
<b>Decanal</b>	4,563 ± 1,095	4,671 ± 1,943	4,459 ± 4,476
<b>Acetato de octilo</b>	0,054 ± 0,067	0,316 ± 0,110	0,219 ± 0,222
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,231 ± 0,054	0,846 ± 0,581	0,592 ± 0,247
<b>Carveol</b>	N.D.	0,024 ± 0,038	N.D.
<b>Neral</b>	0,436 ± 0,097	0,225 ± 0,148	0,203 ± 0,352
<b>Carvona</b>	0,173 ± 0,115	0,201166667	0,253 ± 0,080
<b>Geraniol+linalil acetato</b>	0,186 ± 0,083	0,606 ± 0,283	0,362 ± 0,136
<b>Geranial</b>	0,698 ± 0,053	1,247 ± 0,608	1,206 ± 0,477
<b>Perialdehido</b>	0,123 ± 0,124	0,013 ± 0,033	0,115 ± 0,199
<b>Undecanal</b>	0,845 ± 0,859	0,174 ± 0,067	0,147 ± 0,096
<b>Acet.terpenilo+Acet. citronelilo</b>	0,080 ± 0,073	0,216 ± 0,094	0,102 ± 0,093
<b>Acet.neril</b>	0,116 ± 0,095	0,215 ± 0,112	0,216 ± 0,125
<b>Acet. geranil</b>	0,264 ± 0,348	0,219 ± 0,112	0,206 ± 0,121
<b>Dodecanal</b>	0,280 ± 0,084	0,431 ± 0,187	0,429 ± 0,362
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,107 ± 0,052	0,203 ± 0,093	0,190 ± 0,085
<b>α-Humuleno</b>	N.D.	0,089 ± 0,065	0,140 ± 0,198
<b>Dodecanol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	2,871 ± 2,686	6,305 ± 3,079	9,648 ± 7,042

Tabla IV.5.1.-2.- **REPARTO DE CONSTITUYENTES VOLÁTILES TOTALES ENTRE EL SUERO Y LA PULPA FINA DEL ZUMO DE NARANJA REFINADO**

<b>Componentes</b>	<b>Suero</b>	<b>Pulpa</b>
<b>ALDEHÍDOS</b>		
Valeraldehido+2 Pentanol	+	+
Hexanal+Butirato de etilo	+	+
Octanal	++	+
Nonanal	+	+
Decanal	+	+++
Neral	+	+
Geranial	+	+++
Perialdehido	++++	+
Undecanal	+	++
Dodecanal	+	+++
<b>ALCOHOLES</b>		
3-metil-1-Butanol	+	+
1-Heptanol	+	++
Octanol	+	++
Linalol	+	+
Terpinen-4-ol	+	+++
$\alpha$ -Terpineol	+	+++
Nerol+Citronelol	+	+++
Geraniol+Acetato de linalilo	+	++

**H. TERPÉNICOS**

$\alpha$ -Pinoeno	+	++
Sabineno	+	+++
$\beta$ -Pinoeno	+	+++
$\beta$ -Mirceno	+	+++
$\alpha$ -Terpineno	+	+
Limoneno	+	+++
$\gamma$ -Terpineno	+	++
Cariofileno	+	++
$\alpha$ -Humuleno	+	++
Valenceno	+	+++

**ÉSTERES**

Butirato de metilo	++	+
Acetato de octilo	+	+++
Acet. terpenilo + Acet. citronelilo.	+	+
Acet. nerilo.	+	+
Acet. geranilo.	+	+++

**CETONAS**

Etil-Vinil-Cetona	+	+
Carvona	+	+

++= Presencia entre 60-70%

+++ = Presencia entre 70-80%

++++ = Presencia entre 80-90%

Estos resultados comparados con los publicados por Radford *et al.* en 1974, son coincidentes en relación al mayor reparto de componentes de naturaleza apolar en la pulpa, pero no lo son en cuanto a que componentes de naturaleza polar estén asociados exclusivamente al suero, como sucede en los casos de los alcoholes y los aldehídos procedentes del aceite esencial de la naranja incorporado en el exprimido.

Una conclusión generalizada de los resultados, muestra, que en el reparto de componentes volátiles entre el suero y la pulpa del zumo, a igualdad de volúmenes en la destilación, mayor contenido es detectado en la pulpa fina, esto demuestra el efecto de enriquecimiento en componentes volátiles que supone la presencia de pulpa en el zumo de naranja.

#### **IV.5.2.-Distribución de componentes volátiles. HS-SPME**

La distribución de componentes volátiles entre la pulpa y el suero también ha sido determinada en base a la composición cuantitativa en constituyentes volátiles del espacio de cabeza. Los resultados obtenidos en el análisis de componentes volátiles en pulpa fina mediante PDMS y PA quedan reflejados en las Tablas IV.5.2.-1. y IV.5.2.-2., respectivamente.

El empleo de PDMS y PA en esta determinación conduce a resultados similares a los obtenidos en el análisis de componentes volátiles totales.

En la Tabla IV.5.2.-3. Se comparan los diferentes repartos en el espacio de cabeza del suero y de la pulpa fina. La expresión de los resultados es igual a la utilizada en la descripción de la distribución de componentes volátiles totales.

En la determinación mediante PDMS, los aldehídos de elevada polaridad y volatilidad tales como valeraldehído, hexanal y trans-2-hexenal, son detectados en mayor proporción en el suero. En esta ocasión la excepción corresponde al acetaldehído, componente en el que no se detectan diferencias importantes de concentración en ambas fracciones. El resto de los aldehídos detectados, todos ellos procedentes del aceite esencial de la piel, tienen una mayor afinidad hacia la pulpa, tal como se había descrito en el análisis anterior; los más representativos son octanal, decanal, geranial, undecanal y dodecanal.

Los resultados obtenidos con el empleo de PA son bastante similares a estos; destaca el que no se detecta acetaldehído mediante el recubrimiento polar y también el diferente reparto existente entre la pulpa y el suero detectado con este recubrimiento de trans-2-hexenal, octanal y perialdehído.

Los alcoholes solubles en aceite esencial detectados mediante PDMS y PA, al igual que los aldehídos, aparecen en mayor concentración en la pulpa, siendo los más representativos trans-2-hexen-1-ol, 1-heptanol, octanol, carveol y geraniol.

El reparto de etanol determinado mediante PDMS es bastante próximo en ambas muestras; la presencia de 3-metil-1-butanol es en mayor proporción en el suero que en la pulpa. Estos resultados no coinciden con los obtenidos mediante PA, ya que para estos dos componentes se detectan mayores contenidos en la pulpa que en el suero.

La determinación del reparto en terpenos, dada la naturaleza apolar y la mayor afinidad de los mismos hacia el recubrimiento polimérico de PDMS, muestra una clara tendencia de los mismos hacia la pulpa, siendo estos resultados coincidentes con los encontrados en la determinación mediante PA.

Tabla IV.5.2.-1.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN PULPA FINA HS-SPME (PDMS).**

Componentes (mg/Kg)	Pulpa Fina		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	0,034 ± 0,048	0,223 ± 0,334	0,054 ± 0,094
Etanol	0,826 ± 1,168	0,454 ± 0,908	0,291 ± 0,505
Acetona	22,385 ± 9,029	21,250 ± 5,481	27,014 ± 6,215
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	0,035 ± 0,060
Acetato de etilo	0,757 ± 0,201	2,637 ± 1,819	0,467 ± 0,603
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	0,048 ± 0,097	N.D.
Etil-vinil-cetona	1,523 ± 0,850	0,867 ± 1,442	0,980 ± 0,423
Valeraldehido+2 Pentanol	0,260 ± 0,080	0,231 ± 0,196	0,141 ± 0,105
Butirato de metilo	0,014 ± 0,019	0,003 ± 0,004	0,009 ± 0,009
3-metil-1-Butanol	N.D.	0,264 ± 0,424	N.D.
Hexanal+Butirato de etilo	0,410 ± 0,067	0,513 ± 0,312	0,352 ± 0,067
Furfural	N.D.	N.D.	0,558 ± 0,966
Trans-2-Hexenal	0,014 ± 0,007	0,011 ± 0,022	0,042 ± 0,044
Trans-2-Hexen 1-ol	2,460 ± 0,767	0,219 ± 0,439	0,850 ± 1,109
α-Pineno	9,743 ± 0,222	8,295 ± 3,164	8,768 ± 1,115
1-Heptanol	1,212 ± 0,342	1,155 ± 0,784	1,530 ± 0,217
Sabineno	9,990 ± 0,043	11,231 ± 4,570	10,112 ± 3,002
β-Pineno	0,613 ± 0,348	0,709 ± 0,511	0,515 ± 0,199
β-Mirceno	17,953 ± 0,131	15,796 ± 6,109	16,283 ± 1,324
Octanal	1,292 ± 0,125	3,560 ± 4,260	5,141 ± 2,020
α-Felandreno	6,141 ± 0,651	3,265 ± 2,466	2,492 ± 3,696
Δ <sub>3</sub> -Careno	1,473 ± 1,189	0,312 ± 0,321	3,390 ± 4,868
α-Terpineno	28,043 ± 3,191	24,109 ± 8,992	29,022 ± 2,281



<b>Limoneno</b>	784,400 ± 22,06	683,425 ± 224,56	750,074 ± 37,99
<b>γ-Terpineno</b>	12,235 ± 0,714	10,600 ± 3,991	12,271 ± 1,014
<b>Octanol</b>	5,866 ± 0,698	7,552 ± 2,370	8,129 ± 0,240
<b>Linalol</b>	5,457 ± 1,179	4,593 ± 2,667	8,229 ± 3,060
<b>Nonanal</b>	0,490 ± 0,024	0,203 ± 0,155	0,388 ± 0,289
<b>Citronelal</b>	0,008 ± 0,0005	0,018 ± 0,008	0,006 ± 0,001
<b>Terpinen-4-ol</b>	1,568 ± 0,460	1,179 ± 0,372	1,446 ± 0,422
<b>α-Terpineol</b>	2,287 ± 0,629	2,618 ± 1,842	2,001 ± 1,393
<b>Decanal</b>	0,619 ± 0,009	0,683 ± 0,156	0,554 ± 0,277
<b>Acetato de octilo</b>	0,022 ± 0,004	0,033 ± 0,019	0,039 ± 0,010
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,212 ± 0,013	0,352 ± 0,243	0,375 ± 0,098
<b>Carveol</b>	0,254 ± 0,305	0,247 ± 0,221	0,078 ± 0,075
<b>Neral</b>	0,020 ± 0,007	0,055 ± 0,041	0,016 ± 0,016
<b>Carvona</b>	0,141 ± 0,001	0,185 ± 0,063	0,175 ± 0,056
<b>Geraniol+Acet. linalilo</b>	0,216 ± 0,041	0,222 ± 0,137	0,344 ± 0,185
<b>Geranial</b>	0,088 ± 0,005	0,097 ± 0,092	0,299 ± 0,141
<b>Perialdehido</b>	0,070 ± 0,0007	0,024 ± 0,028	0,063 ± 0,071
<b>Undecanal</b>	0,033 ± 0,002	0,015 ± 0,015	0,028 ± 0,009
<b>Acet. terpenilo +Acet. citronelilo.</b>	0,025 ± 0,022	0,049 ± 0,011	0,053 ± 0,016
<b>Acet.nerilo</b>	0,040 ± 0,002	0,038 ± 0,016	0,036 ± 0,004
<b>Acet. geranilo</b>	0,049 ± 0,009	0,025 ± 0,028	0,033 ± 0,004
<b>Dodecanal</b>	0,137 ± 0,026	0,107 ± 0,015	0,134 ± 0,046
<b>Antranilato de etilo</b>	0,005 ± 0,007	0,396 ± 0,35	0,217 ± 0,362
<b>Cariofileno</b>	0,037 ± 0,002	0,013 ± 0,019	0,020 ± 0,018
<b>α-Humuleno</b>	0,018 ± 0,002	0,016 ± 0,007	0,023 ± 0,009
<b>Dodecanol</b>	0,058 ± 0,017	0,062 ± 0,051	0,032 ± 0,034
<b>Valenceno</b>	1,208 ± 0,438	1,298 ± 1,203	1,342 ± 0,956

Tabla IV.5.2.-2.- **COMPONENTES VOLÁTILES EN PULPA FINA. HS-SPME-PA.**

Componentes (mg/Kg)	Pulpa Fina		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	7,606 ± 10,757	5,190 ± 11,605	10,017 ± 8,702
Acetona	147,864 ± 37,37	196,529 ± 48,31	159,235 ± 22,95
Metil-vinil-cetona	N.D.	0,827 ± 1,159	N.D.
Acetato de etilo	0,947 ± 0,553	1,312 ± 1,467	1,282 ± 1,387
1-Butanol	0,330 ± 0,310	0,045 ± 0,077	N.D.
1-Penten-3-ol	N.D.	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	0,823 ± 0,393	0,134 ± 0,238	0,342 ± 0,510
Valeraldehido+2 Pentanol	N.D.	0,175 ± 0,166	0,361 ± 0,449
Butirato de metilo	0,010 ± 0,015	0,024 ± 0,031	0,005 ± 0,009
3-metil-1-Butanol	0,223 ± 0,127	0,212 ± 0,180	0,399 ± 0,302
Hexanal+Butirato de etilo	0,413 ± 0,072	0,442 ± 0,233	0,326 ± 0,316
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	0,144 ± 0,067	0,186 ± 0,308	0,178 ± 0,174
Trans-2-Hexen 1-ol	1,374 ± 0,141	0,864 ± 0,831	0,746 ± 0,571
α-Pineno	1,958 ± 0,719	2,057 ± 0,742	2,352 ± 0,860
1-Heptanol	N.D.	0,005 ± 0,011	N.D.
Sabineno	2,051 ± 0,329	3,419 ± 1,396	1,264 ± 0,806
β-Pineno	0,144 ± 0,023	0,186 ± 0,116	0,092 ± 0,050
β-Mirceno	4,855 ± 1,279	5,008 ± 1,420	5,896 ± 2,497
Octanal	0,388 ± 0,077	0,191 ± 0,253	N.D.
α-Felandreno	0,087 ± 0,017	0,068 ± 0,061	N.D.
Δ <sub>3</sub> -Careno	0,011 ± 0,012	0,338 ± 0,302	0,207 ± 0,328
α-Terpineno	0,371 ± 0,434	0,045 ± 0,051	0,412 ± 0,499

<b>Limoneno</b>	74,893 ± 34,822	111,481 ± 17,479	116,530 ± 22,345
<b>γ-Terpineno</b>	0,333 ± 0,094	0,473 ± 0,407	0,107 ± 0,176
<b>Octanol</b>	1,075 ± 0,237	0,961 ± 0,833	1,600 ± 0,401
<b>Linalol</b>	1,642 ± 0,942	1,195 ± 0,398	0,319 ± 0,553
<b>Nonanal</b>	0,226 ± 0,024	0,298 ± 0,244	2,235 ± 1,971
<b>Citronelal</b>	0,075 ± 0,092	0,011 ± 0,003	0,006 ± 0,003
<b>Terpinen-4-ol</b>	1,353 ± 0,446	1,093 ± 0,268	1,002 ± 0,453
<b>α-Terpineol</b>	1,238 ± 0,196	2,035 ± 1,053	2,064 ± 0,548
<b>Decanal</b>	0,995 ± 0,187	1,173 ± 0,406	1,189 ± 0,717
<b>Acetato de octilo</b>	0,029 ± 0,001	0,082 ± 0,032	0,084 ± 0,028
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,176 ± 0,051	0,395 ± 0,280	0,318 ± 0,061
<b>Carveol</b>	0,066 ± 0,094	0,289 ± 0,527	0,388 ± 0,420
<b>Neral</b>	0,012 ± 0,003	0,015 ± 0,006	0,011 ± 0,011
<b>Carvona</b>	0,186 ± 0,035	0,222 ± 0,080	0,262 ± 0,046
<b>Geraniol+Acet. linalilo</b>	0,186 ± 0,060	0,233 ± 0,243	0,226 ± 0,185
<b>Geranial</b>	0,078 ± 0,009	0,196 ± 0,115	0,313 ± 0,127
<b>Perialdehido</b>	0,074 ± 0,007	0,076 ± 0,043	0,091 ± 0,100
<b>Undecanal</b>	0,044 ± 0,014	0,056 ± 0,032	0,057 ± 0,016
<b>Acet. terpenilo.+ Acet.citronelilo</b>	0,015 ± 0,001	0,042 ± 0,019	0,040 ± 0,009
<b>Acet. nerilo.</b>	0,029 ± 0,006	0,045 ± 0,012	0,032 ± 0,006
<b>Acet. geranilo.</b>	0,035 ± 0,0007	0,045 ± 0,019	0,033 ± 0,012
<b>Dodecanal</b>	0,125 ± 0,052	0,158 ± 0,045	0,185 ± 0,065
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,036 ± 0,015	0,049 ± 0,013	0,047 ± 0,005
<b>αHumuleno</b>	0,015 ± 0,007	0,027 ± 0,012	0,034 ± 0,010
<b>Dodecanol</b>	0,030 ± 0,001	0,036 ± 0,026	0,029 ± 0,026
<b>Valenceno</b>	0,971 ± 0,019	1,447 ± 0,727	2,079 ± 1,590

Tabla IV.5.2.-3. - REPARTO DE CONSTITUYENTES VOLÁTILES ENTRE SUERO Y PULPA FINA DEL ZUMO DE NARANJA REFINADO. HS-SPME

Componentes	PDMS		PA	
	Suero	Pulpa	Suero	Pulpa
<b>ALDEHÍDOS</b>				
Acetaldehído	+	+	N.D.	N.D.
Valeraldehído+2 Pentanol	++	+	++	+
Hexanal+Butirato de etilo	++	+	++	+
Trans-2-Hexenal	++	+	+	++++
Octanal	+	+++	++++	+
Nonanal	+	+++	+	++++
Citronelal	+	++	+	++++
Decanal	+	+++	+	+++
Neral	+	+++	+	+++
Geranial	+	+++	+	++++
Perialdehído	+	+	++	+
Undecanal	+	+++	+	++++
Dodecanal	+	+++	+	+++++
<b>ALCOHOLES</b>				
Etanol	+	+	+	++++
1-Butanol	N.D.	N.D.	+	++++
1-Penten-3-ol	--	+	N.D.	N.D.
3-Metil-1-butanol	++++	+	+	++
Trans-2-hexen-1-ol	+	++++	+	++++
1-Heptanol	+	++++		N.D.
Octanol	+	++++	+	+++++
Linalol	+	+++	++	+
Terpinen-4-ol	+	++	++	+
$\alpha$ -Terpineol	+	++	+	++++
Nerol+Citronelol	+	+++	+	++++
Carveol	+	+++	+	+++
Geraniol+Acetato de linalilo	+	++++	+	++++
Dodecanol	+	+++	+	+++

<b>H. TERPÉNICOS</b>				
$\alpha$ -Pino	+	+++++	+	++++
Sabino	+	+++++	+	++++
$\beta$ -Pino	+	+++++	+	++
$\beta$ -Mirreno	+	+++++	+	++++
$\alpha$ -Terpino	+	+++++	++	+
Limoneno	+	+++++	+	+++
$\gamma$ -Terpino	+	+++++	+	+++
Cariofileno	+	+++	+	++++
$\alpha$ -Humuleno	+	+++++	++	+
Valenceno	+	+++++	+	++++
<b>ÉSTERES</b>				
Acetato de etilo	+	+++	+	+++
Butirato de metilo	+++	+	+	+
Acetato de octilo	+	+	+	++++
Acet. terpenilo + Acet. citronelilo.	+	+++	+	++++
Acet. nerilo.	+	++++	+	++++
Acet. geranilo.	+	+++	+	+++
Antranilato de etilo	+	+++	N.D.	N.D.
<b>CETONAS</b>				
Acetona	++	+	+	+
Metil-vinil-cetona	++++	+	+	+
Etil-vinil-cetona	++	+	+	+++
Carvona	+	+++	+	+++

++= Presencia entre 60-70%

+++ = Presencia 70-80%

++++ = Presencia 80-90%

+++++ = Presencia > 90%

Ésteres y cetonas, al igual que en el análisis de componentes volátiles y dependiendo de sus características polares, son detectados en mayor o menor proporción en ambas fases; así todos los ésteres analizados con excepción del butirato de metilo (en PDMS) se encuentran en mayor proporción en la pulpa.

Las cetonas estudiadas mediante PDMS, dado su carácter de polaridad media son detectadas en mayor proporción en el suero. No obstante, carvona de menor polaridad queda más asociada a la pulpa que el resto de cetonas. Este comportamiento coincidente con el encontrado en el análisis de componentes volátiles totales, no se registra en el estudio mediante PA como consecuencia de la escasa adecuación de este polímero en la determinación de las cetonas.

De los resultados obtenidos en el análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza, destacamos la asociación de la mayoría de los constituyentes de la fracción aromática a la pulpa, quedando este hecho más remarcado cuando se emplea Poliacrilato como recubrimiento polimérico en la fibra, excepto para el caso de los terpenos, ya que la afinidad de estos hacia el Polidimetil siloxano, hace que el análisis del reparto quede más remarcado mediante este recubrimiento.

#### **IV.6.- COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN SUBPRODUCTOS. PULPA GRUESA**

De acuerdo con el esquema de transformación industrial de la naranja (Fig. 1.2) el zumo bruto obtenido tras el exprimido de los frutos es tamizado mediante una refinadora mecánica de tornillo sin fin. El paso del zumo a través de un tamiz con tamaño de poro comprendido entre 0,6 y 0,8 mm hace que la pulpa gruesa en suspensión se separe fácilmente del resto del zumo.

Estas pulpas son, en ocasiones, consideradas en la industria como un subproducto que se reincorpora a las cortezas extraídas y, principalmente, se destinan a alimentación animal o, excepcionalmente en el caso de la naranja, se utilizan como materia prima para la obtención de pectinas. Más recientemente son aprovechadas para utilización en la elaboración de bebidas y derivados como naranjadas, néctares y en la fabricación de mermeladas y productos de confitería, etc.

Por este motivo en este apartado estudiamos la fracción aromática de este producto, para conocer incluso posibles aplicaciones del mismo como fuente de componentes aromáticos.

Los resultados obtenidos por destilación-extracción de la pulpa gruesa, tal como se expone en la parte experimental (III.3.1.), quedan reflejados en la Tabla IV.6.-1.

A nivel cualitativo no se detectan diferencias en cuanto a la composición de la fracción aromática presente en la pulpa gruesa con respecto a los componentes volátiles recuperados del zumo de naranja respectivo. Cuantitativamente, destaca el hecho de que las concentraciones determinadas superan en algunos de los casos a las presentes en el zumo de naranja refinado.

Tabla IV.6.-1.-**COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN LA PULPA GRUESA**

Componentes (mg/Kg)	Pulpa Gruesa		
	Enero	Abril	Mayo
Acetaldehido	N.D.	N.D.	N.D.
Etanol	N.D.	N.D.	N.D.
Acetona	N.D.	N.D.	N.D.
Metil-vinil-cetona	N.D.	N.D.	N.D.
Acetato de etilo	N.D.	N.D.	N.D.
1-Butanol	N.D.	N.D.	N.D.
1-Penten-3-ol	7,440 ± 10,521	N.D.	N.D.
Etil-vinil-cetona	3,083 ± 0,273	1,686 ± 1,435	N.D.
Valeraldehido+2 Pentanol	0,600 ± 0,150	1,439 ± 1,267	N.D.
Butirato de metilo	N.D.	0,127 ± 0,112	N.D.
3-metil-1-butanol	0,983 ± 0,966	0,115 ± 0,137	0,055 ± 0,096
Hexanal+Butirato de etilo	N.D.	0,589 ± 0,218	0,425 ± 0,105
Furfural	N.D.	N.D.	N.D.
Trans-2-Hexenal	N.D.	N.D.	0,118 ± 0,205
Trans-2-Hexen 1-ol	N.D.	N.D.	N.D.
α-Pineno	2,645 ± 0,770	0,044 ± 0,049	0,019 ± 0,033
1-Heptanol	N.D.	1,271 ± 0,450	1,448 ± 0,530
Sabineno	0,906 ± 0,475	1,092 ± 0,321	0,414 ± 0,343
β-Pineno	0,364 ± 0,205	0,231 ± 0,128	0,072 ± 0,061
β-Mirceno	12,318 ± 5,333	6,454 ± 2,227	7,396 ± 2,761
Octanal	7,690 ± 3,662	1,775 ± 1,061	2,762 ± 2,590
α-Felandreno	0,271 ± 0,384	N.D.	N.D.
Δ3-Careno	1,717 ± 1,474	0,313 ± 0,213	0,364 ± 0,049
α-Terpineno	0,461 ± 0,409	0,220 ± 0,051	0,073 ± 0,064



<b>Limoneno</b>	786,110 ± 394,83	421,147 ± 147,58	491,183 ± 173,59
<b>γ-Terpineno</b>	0,956 ± 0,589	0,727 ± 0,472	0,771 ± 0,518
<b>Octanol</b>	4,729 ± 4,071	4,621 ± 2,667	3,270 ± 0,641
<b>Linalol</b>	10,965 ± 5,706	9,982 ± 3,635	10,557 ± 4,543
<b>Nonanal</b>	1,186 ± 0,712	0,413 ± 0,268	0,527 ± 0,259
<b>Citronelal</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Terpinen-4-ol</b>	3,541 ± 2,510	2,009 ± 0,525	1,489 ± 1,060
<b>α-Terpineol</b>	2,617 ± 0,512	1,665 ± 0,708	1,868 ± 0,221
<b>Decanal</b>	4,127 ± 2,945	2,366 ± 1,980	2,222 ± 2,170
<b>Acetato de octilo</b>	0,072 ± 0,102	0,037 ± 0,065	0,090 ± 0,108
<b>Nerol+Citronelol</b>	0,931 ± 0,365	1,131 ± 0,500	0,657 ± 0,175
<b>Carveol</b>	0,087 ± 0,123	0,003 ± 0,008	0,012 ± 0,021
<b>Neral</b>	0,697 ± 0,559	0,214 ± 0,302	0,149 ± 0,164
<b>Carvona</b>	0,398 ± 0,271	0,257 ± 0,158	0,261 ± 0,100
<b>Geraniol+Acet. de linalilo</b>	0,360 ± 0,339	0,424 ± 0,232	0,342 ± 0,093
<b>Geranial</b>	0,971 ± 0,818	0,507 ± 0,431	0,489 ± 0,098
<b>Perialdehido</b>	0,229 ± 0,145	0,028 ± 0,046	0,174 ± 0,175
<b>Undecanal</b>	0,137 ± 0,017	0,029 ± 0,047	0,091 ± 0,102
<b>Acet. terpenilo + Acet. citronelilo</b>	0,022 ± 0,031	0,092 ± 0,086	N.D.
<b>Acet.nerilo</b>	0,761 ± 0,609	0,134 ± 0,109	0,227 ± 0,281
<b>Acet. geranilo.</b>	0,135 ± 0,048	0,055 ± 0,045	0,036 ± 0,062
<b>Dodecanal</b>	0,175 ± 0,247	0,161 ± 0,249	0,287 ± 0,107
<b>Antranilato de etilo</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Cariofileno</b>	0,106 ± 0,047	0,077 ± 0,042	0,180 ± 0,156
<b>α-Humuleno</b>	N.D.	0,010 ± 0,020	0,080 ± 0,094
<b>Dodecanol</b>	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Valenceno</b>	3,923 ± 2,229	2,973 ± 1,380	14,963 ± 10,700

Con relación a los aldehídos, aquellos que proceden del aceite esencial y como ha sido comprobado en el apartado anterior quedan más asociados a la pulpa que al suero; están presentes en esta a concentraciones absolutas que superan a las detectadas en el zumo de naranja, el mismo comportamiento se detecta en los alcoholes, ésteres y cetonas, pero no es así para los terpenos en los que las concentraciones halladas son más próximas a las presentes en el zumo de naranja sin llegar a superarlas.

Un análisis de varianza simple entre las concentraciones de los diferentes constituyentes aromáticos en la pulpa y el zumo de naranja refinado, muestra la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de las concentraciones detectadas (Tabla IV.6.-2.).

Tabla. IV.6.-2.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. ZUMO REFINADO-PULPA GRUESA.**

	<b>ALDEHIDOS</b>	<b>ALCOHOLES</b>	<b>H.TERPÉNICOS</b>	<b>ESTERES</b>	<b>CETONAS</b>
<b>ZUMO REFINADO</b>	7,33 ± 5,41 <sup>a</sup>	18,63 ± 8,24 <sup>a</sup>	747,90 ± 456,20 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,54 <sup>a</sup>	1,52 ± 1,46 <sup>a</sup>
<b>PULPA GRUESA</b>	9,86 ± 6,02 <sup>a</sup>	19,03 ± 8,25 <sup>a</sup>	526,80 ± 222,50 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,51 <sup>a</sup>	2,48 ± 4,26 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

De acuerdo con estos resultados, el contenido medio en componentes volátiles en el zumo refinado es de 775,9 mg/Kg, es decir

un 0,077% del peso total de zumo analizado, frente a los 558,75 mg/Kg el 0,056% cuantificados en la pulpa gruesa.

De estos resultados deducimos que la pulpa gruesa considerada como producto de desecho puede ser empleada como fuente para la extracción de componentes volátiles y de esta manera enriquecer la fracción aromática del producto industrial acabado, en el que como se ha comprobado en los apartados anteriores sufre una pérdida importante de los mismos como consecuencia de los tratamientos tecnológicos a los que queda sometido durante el procesado industrial, llegando a cuantificarse un contenido en componentes volátiles de 198,05 mg/Kg, correspondientes a un 0,019% del peso total del zumo estudiado.

#### **IV.7.- INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL ZUMO DE NARANJA.**

Como se ha indicado en la sección de material y métodos, las muestras analizadas han sido recogidas en la industria durante los meses de enero, abril y mayo. En este periodo de tiempo varían sensiblemente los factores que definen las características del zumo de naranja, entre los que se incluye como más representativo el índice de madurez de la fruta.

Norman en 1977 define la existencia de una correlación entre la evolución del contenido en azúcar, acidez, color y flavor con respecto a la maduración de la fruta. El flavor usualmente desarrolla todo su aroma cuando el contenido en azúcares es máximo y el color de la piel o de la corteza adquiere su matiz brillante, es decir en su estado fisiológico de madurez óptima. Sin embargo, cuando la fruta comienza a sobremadurar el color se torna apagado y el flavor cambia su composición aromática y pierde sus volátiles más frescos.

Sobre la base de esto, y dado que el grado de madurez afecta al contenido en componentes volátiles, en este apartado comparamos la evolución de la fracción aromática total y en el espacio de cabeza del zumo de naranja exprimido a mano, por ser este el más rico en componentes de elevada volatilidad.

#### **IV.7.1.- Evolución de los componentes volátiles. SDE**

Los resultados obtenidos en la destilación de las muestras de zumo de naranja exprimido a mano durante los meses de enero, abril y mayo, se incluyen en la Tabla IV.3.1.-1., recogida en el apartado correspondiente.

Dadas las limitaciones del método de recuperación de los constituyentes volátiles especificadas anteriormente, mediante este procedimiento no podemos observar la evolución de los componentes de mayor volatilidad ya que, de todos los componentes estudiados en esta Memoria, los más estrechamente relacionados con la calidad de la fruta fresca (acetaldehído, metanol, etanol y acetato de etilo), identificados por Norman (1977) en la emanación de frutos, se caracterizan especialmente por su alta volatilidad.

Un dato representativo de la influencia del índice de madurez sobre la fracción aromática del zumo de naranja es sin duda, el análisis de varianza simple sobre las concentraciones de los componentes volátiles representados en la Tabla .IV.7.-1.

Se detectan diferencias significativas en el contenido de aldehídos y cetonas, de estos componentes se observa una disminución importante de su concentración a medida que aumenta el índice de madurez de la naranja. Los alcoholes no modifican apenas su concentración y en el caso de los térpenos y los ésteres la variabilidad de los resultados impide destacar las diferencias existentes entre los

valores absolutos de las medias obtenidas entre los meses de enero, abril y mayo.

Tabla. IV.7.-1.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LOS COMPONENTES VOLÁTILES TOTALES EN EL ZUMO DE NARANJA EXPRIMIDO A MANO.**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>ENERO</b>	3,74 ± 1,82 <sup>a</sup>	1,88 ± 2,36 <sup>a</sup>	62,86 ± 40,99 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,24 ± 2,26 <sup>a</sup>
<b>ABRIL</b>	1,81 ± 0,79 <sup>a,b</sup>	0,94 ± 0,47 <sup>a</sup>	35,49 ± 9,56 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,00 ± 0,53 <sup>b</sup>
<b>MAYO</b>	0,82 ± 0,41 <sup>b</sup>	1,71 ± 0,71 <sup>a</sup>	52,60 ± 25,26 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,22 <sup>b</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

A nivel individual, en los aldehídos existen pérdidas importantes, así, valeraldehído, octanal, nonanal, decanal y neral disminuyen su contenido del mes de enero al mes de abril, llegando a no ser detectados en las muestras correspondientes al mes de mayo.

Los alcoholes detectados, al igual que terpenos y ésteres, no modifican sensiblemente su concentración durante los meses estudiados.

Las cetonas etil-vinil-cetona y carvona evolucionan de forma distinta. Así, etil-vinil-cetona disminuye su contenido a medida que aumenta el índice de madurez, no apareciendo en las muestras del mes de mayo. Por el contrario, carvona, componente procedente de la degradación del limoneno que no se detecta en el mes de enero aparece aumentando su concentración en los meses de abril y mayo.

#### **IV.7.2.- Evolución de los componentes volátiles. HS-SPME**

La incidencia del grado de madurez de la naranja sobre la composición de su fracción volátil, resulta más precisa mediante el análisis en espacio de cabeza, ya que conseguimos detectar aquellos componentes que, según Norman (1977), definen la calidad del fruto fresco. Los resultados obtenidos del análisis del espacio de cabeza mediante PDMS y PA como recubrimientos poliméricos quedan representados respectivamente en las Tablas IV.3.2.1.-1 y IV.3.2.1.-2.

La diferencia de selectividad entre ambos recubrimientos poliméricos hace que los resultados obtenidos para algunos de los componentes sean distintos. Así, ya vimos que acetaldehído y etanol no son detectados mediante el recubrimiento de PA.

El estudio mediante PDMS muestra, para estos componentes definitorios del estado de madurez, un aumento progresivo de la concentración, con excepción de acetaldehído que únicamente es valorado en las muestras correspondientes al mes de abril, lo que representa un aumento de la calidad aromática de la naranja estudiada durante los meses de enero a mayo.

El comportamiento del resto de componentes detectados mediante PDMS es bastante similar a lo largo del periodo de muestreo; se observa un ligero aumento de concentración en algunos de ellos, frente al resultado obtenido con PA, con el que se observa una disminución de la concentración, siendo los resultados coincidentes con los encontrados en la destilación del zumo.

El análisis de varianza simple aplicado a los resultados obtenidos para ambos recubrimientos queda reflejado en las Tablas IV.7.2.-1., IV.7.2.-2.

Tabla. IV.7.2.-1.-. . **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LOS COMPONENTES VOLÁTILES EN EL ZUMO DE NARANJA EXPRIMIDO A MANO. HS-SPME (PDMS).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>ENERO</b>	1,31 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,99 ± 0,28 <sup>a</sup>	13,61 ± 6,22 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,47 <sup>a</sup>	55,63 ± 38,04 <sup>a</sup>
<b>ABRIL</b>	1,37 ± 0,70 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,69 <sup>a</sup>	9,76 ± 2,25 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,33 <sup>a</sup>	26,87 ± 8,26 <sup>a</sup>
<b>MAYO</b>	1,05 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,92 <sup>a</sup>	9,86 ± 2,64 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,67 <sup>a</sup>	48,21 ± 10,74 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$

Tabla. IV.7.2.-2.-. **ANÁLISIS DE VARIANZA SIMPLE. INFLUENCIA DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LOS COMPONENTES VOLÁTILES EN EL ZUMO DE NARANJA EXPRIMIDO A MANO. HS-SPME-(PA).**

	ALDEHIDOS	ALCOHOLES	H.TERPÉNICOS	ESTERES	CETONAS
<b>ENERO</b>	0,98 ± 0,11 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,53 <sup>a</sup>	12,53 ± 5,77 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,54 <sup>a</sup>	181,90 ± 42,51 <sup>a</sup>
<b>ABRIL</b>	0,93 ± 0,61 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,51 <sup>a</sup>	6,53 ± 1,82 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,39 <sup>a</sup>	240,30 ± 91,39 <sup>a</sup>
<b>MAYO</b>	0,58 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,87 ± 4,59 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,43 <sup>a</sup>	378,90 ± 169,40 <sup>a</sup>

Los valores de las medias con subíndices distintos muestran diferencias significativas entre sí, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ )

De estos datos se deduce que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes valores obtenidos. Por todo ello, mediante el análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza por la técnica de SPME no se registran modificaciones de concentración significativas relacionadas con el estado de madurez de la naranja.

## **CONCLUSIONES**





**PRIMERA.**- El sistema de destilación-extracción simultánea (SDE) para la determinación de constituyentes volátiles, únicamente es favorable en la recuperación de componentes de menor volatilidad que el disolvente orgánico utilizado y de afinidad química apropiada. Para la determinación de componentes volátiles totales en el zumo de naranja es adecuado para el análisis de hidrocarburos terpénicos y aldehídos, alcoholes y ésteres, de elevado peso molecular.

**SEGUNDA.**- En la microextracción en fase sólida (SPME), la capacidad de adsorción de componentes volátiles sobre el recubrimiento polimérico, se favorece por el aumento de la fuerza iónica. Contrariamente, al incrementar la temperatura y la agitación en las muestras se modifica el conjunto de la retención de los componentes.

**TERCERA.**- Los diferentes tiempos de exposición requeridos para alcanzar el equilibrio químico de concentraciones, con

polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA), concluyen que la determinación cuantitativa de los constituyentes aromáticos se favorece con el empleo de PDMS, por la mayor homogeneidad de los tiempos de exposición y la reducción del tiempo de análisis.

**CUARTA.-** De la adecuación de los recubrimientos poliméricos sobre la determinación de componentes volátiles se deduce, que en zumos con elevado contenido en componentes de volatilidad alta y media, la retención de los constituyentes de baja polaridad es mucho más efectiva en PDMS que en PA. Sin embargo, los componentes claramente solubles en agua son retenidos mayoritariamente en el recubrimiento de PA. Mientras que muestras con un contenido elevado en componentes de alta volatilidad y menor presencia de componentes de volatilidad media, la capacidad de retención del PDMS supera la del PA en los componentes oxigenados solubles en aceite esencial, pero no en los componentes terpénicos, ya que no se detectan diferencias importantes a nivel cuantitativo en su determinación.

**QUINTA.-** El empleo de SPME a nivel cualitativo rinde resultados que superan a los obtenidos por SDE, al detectarse componentes de elevada volatilidad. Cuantitativamente, se obtiene una mayor reproducibilidad de resultados en SDE.

**SEXTA.-** El análisis cualitativo y cuantitativo en el zumo de naranja exprimido a mano por SDE permite el aislamiento de treinta y seis constituyentes aromáticos, mientras que por SPME cuarenta y ocho y

cuarenta y cinco componentes se recuperan con el empleo de PDMS y PA, respectivamente.

**SÉPTIMA.-** En zumo de naranja comercial se determina un menor número de constituyentes de elevada volatilidad. Los datos que mejor reflejan las diferencias aromáticas existentes entre el zumo exprimido a mano y el zumo industrial corresponden a la incorporación de aceite esencial de la corteza de la naranja durante el proceso de extracción.

**OCTAVA.-** La disminución del contenido de pulpa en el zumo supone pérdidas de componentes de polaridad media y baja, especialmente hidrocarburos terpénicos. Únicamente los aldehídos son extraídos en mayor concentración, dada la mayor afinidad de estos por el agua y el efecto represivo que ejerce la pulpa sobre la recuperación durante la destilación. Sobre la fracción aromática en espacio de cabeza, las disminuciones encontradas en el contenido de aldehídos y alcoholes no detectadas por SDE se deben a la dinámica de adsorción de los componentes de naturaleza polar

**NOVENA.-** El proceso de desaireación-desaceitado del zumo de naranja refinado produce pérdidas importantes de aldehídos, alcoholes e hidrocarburos terpénicos y en menor medida cetonas y ésteres de alto peso molecular. El ligero tratamiento térmico aplicado al zumo no genera nuevos componentes responsables de aromas desagradables.

**DÉCIMA.-** El zumo desaceitado, empobrecido en constituyentes volátiles, no sufre cambios significativos por el proceso de pasteurización, incluso en las enérgicas condiciones aplicadas de temperatura-tiempo.

**UNDÉCIMA.-** El efecto global del procesado industrial sobre la composición aromática del zumo resulta beneficioso por la reducción de determinados componentes que a elevados niveles suponen el desarrollo de aromas extraños (decanal y  $\alpha$ -terpineol). Por el contrario, se pierden componentes de elevada volatilidad (acetato de etilo y butiratos de metilo y etilo) que confieren al zumo el aroma frutal característico, o quedan por debajo de su umbral de detección.

**DUODÉCIMA.-** Se determina el mayor reparto de componentes de naturaleza polar en el suero del zumo, con excepción de aquellos componentes de polaridad media solubles en el aceite esencial de la naranja que se detectan en mayor concentración en la pulpa fina. El análisis del espacio de cabeza destaca la asociación de la mayoría de los constituyentes de la fracción aromática a la pulpa cuando se emplea la fibra de PA, excepto los hidrocarburos terpénicos que, más afines hacia el PDMS, evidencian más este hecho al utilizar este recubrimiento polimérico.

**DECIMOTERCERA.-** El análisis de los constituyentes aromáticos de la pulpa gruesa demuestra la presencia de componentes volátiles que, para algunos integrantes, es superior a la determinada en el zumo, por lo que podría ser utilizada como fuente para recuperar la fracción aromática.

**DECIMOCUARTA.-** Al avanzar la campaña de elaboración del zumo de naranja aumenta la concentración de componentes definitorios de la calidad de la fruta fresca (acetaldehído, etanol y acetato de etilo) mientras se detecta la disminución de aldehidos característicos del aceite esencial (valeraldehído, octanal, nonanal, decanal y neral).

Mediante el sistema SDE se detecta que carvona, considerada como índice de degradación de la fracción aromática del zumo, aumenta su presencia con la maduración de la fruta.

## **RESUMEN/SUMMARY**





Teniendo en cuenta la importancia del aroma en la aceptación de los alimentos por parte del consumidor, en esta Memoria abordamos el estudio de la fracción aromática del zumo de naranja, así como las posibles alteraciones que pueda sufrir durante el procesado industrial.

El análisis de componentes volátiles totales se realiza mediante la aplicación de la destilación-extracción simultánea (SDE). Esta técnica es favorable en la recuperación de componentes de menor volatilidad que el disolvente orgánico utilizado, por lo que es adecuado para el análisis de hidrocarburos terpénicos, así como aldehídos, alcoholes y ésteres de elevado peso molecular.

La microextracción en fase sólida se aplica para el análisis de componentes volátiles en espacio de cabeza, empleando para ello dos recubrimientos poliméricos, uno de naturaleza apolar PDMS (polidimetil siloxano) y otro de naturaleza polar PA (poliacrilato).

El estudio de la fracción aromática del zumo de naranja exprimido a mano muestra la elevada eficiencia de la microextracción en fase sólida para la determinación de los componentes volátiles frente a la destilación-extracción simultánea. En el análisis de componentes volátiles totales, treinta y seis componentes son identificados frente a los cuarenta y ocho detectados en espacio de cabeza. Estas diferencias se asocian a las pérdidas de los componentes de elevada volatilidad durante la destilación y posterior concentración.

El análisis de la fracción aromática presente en el zumo de naranja exprimido a mano y el zumo pasteurizado revela la importancia de la riqueza del zumo en constituyentes de elevada volatilidad. El zumo pasteurizado presenta un perfil aromático pobre en estos componentes y una mayor abundancia en constituyentes característicos del aceite esencial de la naranja, incorporados al zumo durante el proceso de extracción industrial. Este efecto queda más remarcado cuando se emplea polidimetil siloxano que poliacrilato como recubrimiento polimérico. Se deduce la importancia del empleo de un tipo de fibra u otro dependiendo de la composición y naturaleza de la muestra a estudiar.

La incidencia del procesado industrial sobre la fracción aromática muestra un efecto positivo en la disminución de la concentración de determinados componentes como decanal y  $\alpha$ -terpineol que a elevadas concentraciones desarrollan aromas desagradables, frente a la pérdida de los componentes de mayor volatilidad caracterizados por conferir al zumo el aroma frutal.

Se estudia la afinidad de los distintos componentes aromáticos hacia la pulpa fina y el suero, resaltando la asociación de la mayoría de los constituyentes de la fracción aromática a la pulpa.

Se determina la composición aromática en la pulpa gruesa, destacando que esta podría ser utilizada como fuente para enriquecer la fracción aromática de los zumos de naranja procesados en la industria.

El índice de madurez de la fruta afecta a la calidad de la fracción aromática del zumo. Se observa el incremento de la concentración de acetaldehído, etanol y acetato de etilo, componentes definatorios de la calidad de la fruta fresca, y la disminución de los aldehídos característicos del aceite esencial de la naranja, valeraldehído, octanal, nonanal, decanal y neral, frente a un aumento de la concentración de carvona, considerada como índice de degradación de la fracción aromática del zumo.

The importance of the aroma in food is known because of the acceptance by the consumer. For this reason, in this work we study the aromatic fraction present in orange juice, as well as, the changes that could happen during the industrial processing.

In the analysis of volatile compounds we used steam-distillation-extraction (SDE) device. This technique is suitable for the determination of components with lower volatility than the solvent used. Solid-phase-microextraction (SPME) has been chosen for the analysis of the head-space in orange juice. Two polymeric fibers coatings were used: Polidimetilxilosane (PDMS) y Polyacrilate (PA).

The study of volatile components in hand-squeezed orange juice by SPME shows the high efficiency of this device. 48 components were isolated, while 36 by SDE. These differences are associated with the leaks which happened during the distillation and the subsequent concentration step.

The comparative analysis between hand-squeezed and pasteurised orange juice shows the importance of the components with high volatility in the juice aroma. Pasteurised orange juice presents a poor profile in these components and a high concentration in characteristic essential oil components, these are incorporated during the extraction process. These differences were more indicated when PDMS was applied. This highlights the importance of the polymeric coating in the analysis of volatile components.

The influence of the industrial processing on the aromatic fraction shows a positive effect, since it is favourable in the decrease of the concentration of certain compounds like decanal and  $\alpha$ -terpineol. When these components are present in a high concentration, they develop a typical off-flavour. However, there is a big loss in the presence of components with high volatility, which are characterised to produce the delicate fresh orange juice flavour.

Another parameter studied is the distribution of volatile compounds between the pulp and the serum, and most of them are associated with the pulp.

The aromatic fraction isolated from the thick pulp, confirm that these products can be used as a source of volatile components to improve the aroma in the processed orange juice.

The ripening ratio in the fruit describes the aroma quality of the fruit juice, in this way, we observed an increase in the concentration of acetaldehyde, ethanol and ethyl acetate (components which define the fresh fruit quality). However, a decrease in the characteristics components of the essential oil, like valeraldehyde, octanal, nonanal y decanal was determined. Carvona increases its concentration. This compound has been considered as a degradation index of the aromatic fraction.