



## **APLICACIÓN DE LA CROMATOGRFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA**

**Laura Aceña Muñoz**

**ISBN: 9788469432341**  
**Dipòsit Legal: T. 1040-2011**

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

# **APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES- OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN DEL AROMA DEL VINAGRE, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA**

Laura Aceña Muñoz

TESIS DOCTORAL

dirigida por las doctoras Montserrat Mestres Solé y Olga Busto Busto

Departamento de Química Analítica y Química Orgánica



Tarragona, 2011

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011



UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA  
I QUÍMICA ORGÁNICA

C/ Marcel·lí Domingo s/n  
Campus Sescelades  
43007 Tarragona  
Tel. 34 977 55 97 69  
Fax 34 977 55 84 46  
e-mail: secqaqo@urv.cat

Montserrat Mestres Solé, profesora agregada, y Olga Busto Busto, profesora titular del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Universidad Rovira i Virgili,

CERTIFICAMOS:

Que el presente trabajo, que lleva por título "*APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN DEL AROMA DEL VINAGRE, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA*", ha sido realizado, bajo nuestra dirección, por LAURA ACEÑA MUÑOZ para la obtención del título de Doctora, en el Grupo de Química Analítica Enológica y de los Alimentos del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de esta Universidad y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por dicha doctoranda.

Tarragona, 28 de enero de 2011

Dra. Montserrat Mestres Solé

Dra. Olga Busto Busto

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011



Este trabajo ha constituido una de las líneas de investigación del Grupo de Química Analítica Enológica y de los Alimentos de la Universidad Rovira i Virgili. Todos los resultados que se presentan en esta memoria son fruto de los experimentos realizados en su laboratorio de la Facultad de Enología de Tarragona.



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

*Parece que por fin llega el final. No ha sido fácil, pero hubiera sido aún más difícil sin todas aquellas personas que han estado a mi lado en algún momento de la elaboración de esta Tesis Doctoral, y a las que quiero agradecer que, de una manera u otra, me hayan ayudado a seguir.*

*En primer lugar, gracias a la Dra. Olga Busto y a la Dra. Montserrat Mestres por su confianza.*

*Olga, gracias por pensar en mí y darme la oportunidad de empezar el doctorado. Por tu seguridad absoluta desde el primer día en que todo esto terminaría bien y por animarme a conseguirlo. Montse, gracias por tu trabajo incansable, por tu dedicación y tu guía. Por “empujarme” cuando más lo necesitaba, aunque no siempre supiera verlo. Buena parte del éxito de este trabajo te lo debo a ti.*

*Gracias también al Dr. Josep Guasch, por su sabiduría y disponibilidad.*

*Gracias a la gente del laboratorio que ha compartido conmigo todos estos años. A Pili, por introducirme en el mundo de los aromas y por ser como es. A Susanna, por su amistad incondicional desde el primer día y por todo lo que hemos vivido juntas. A Luciano, por ser mi compañero y amigo, por las confidencias y las risas, y por aguantarme día tras día. A Sandra F. y Sandra J., por los buenos momentos pasados.*

*También me gustaría dar las gracias al resto de miembros del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica que han estado dispuestos a escucharme y ayudarme, aunque fuese oliendo vinagres! Gracias a Vanessa, Idoia, Antonio, Rafa, Ígor, Irene, Cris F., Ricard... Especialmente, gracias a Jaume y Santi. Por todo. No hace falta que os diga nada más.*

*Y gracias a Cris B. Por preocuparte por mí, por animarme hasta el final, por estar siempre ahí. Por tus palabras de aliento y tu confianza. Gracias por ser mi amiga.*

*A Jesús y Mari les estoy infinitamente agradecida por haberme acogido en su casa sin conocerme, y por haberme hecho sentir parte de su familia desde el primer momento. Nada hubiera sido igual sin vosotros. Quizá no hubiera llegado hasta aquí.*

*Gracias también a Antonio y Geles y a todos los demás por haberme hecho sentir una más de vosotros.*

*Gracias a Eva, Sonia y Pati, por haberme apoyado desde la distancia.*

*Y por último, gracias a mi familia.*

*Papá, Angelines y Pul, gracias. Por haber cuidado de mí y haberme ayudado a ser quien soy. Por estar siempre a mi lado y por quererme. Por ser lo mejor que tengo.*

*Javier, gracias por haber estado conmigo cuando más lo he necesitado. Gracias por animarme, apoyarme y confiar en que todo esto saldría adelante. Gracias por tu paciencia y tu buen humor, sé que no siempre ha sido fácil.*

*Mamá, gracias. Sin ti, nada habría sido posible.*

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

A mi padre, a mi hermano y a Javier.

A mi madre.

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

*“Quien domina los olores,  
domina el corazón de los hombres”*

Patrick Süskind

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## ÍNDICE

<b>OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: Presentación</b>	<b>5</b>
Bibliografía	13
<b>CAPÍTULO 2: El aroma</b>	<b>15</b>
2.1. La percepción sensorial	17
2.1.1. Anatomía del olfato	18
2.1.2. Fisiología del olfato	20
2.1.3. Anatomía del gusto	22
2.1.4. Fisiología del gusto	24
2.2. El aroma	25
2.2.1. Clasificación de los olores	26
2.2.2. Relación estructura-olor	28
2.2.3. Dimensión de los olores	29
2.2.4. Valor de aroma	31
2.2.5. Compuestos aromáticos con carácter impacto ( <i>key odorants</i> )	32
2.2.6. Compuestos aromáticos en los alimentos	33
2.2.7. Olores anómalos ( <i>off-flavours</i> )	35
2.3. El análisis del aroma	36
2.3.1. El análisis sensorial	37
2.3.1.1. El panel sensorial	37
2.3.1.2. Las pruebas sensoriales	39
2.3.2. El análisis instrumental	40
2.3.2.1. Las técnicas de pretratamiento	40
2.3.2.2. La cromatografía de gases	48



2.3.2.3. La nariz electrónica	50
Bibliografía	52
<b>CAPÍTULO 3: La cromatografía de gases-olfatometría (GCO)</b>	<b>57</b>
3.1. El análisis del aroma mediante GCO	59
3.2. La cromatografía de gases-olfatometría	60
3.2.1. Las técnicas olfatométricas	63
3.2.2. Limitaciones de la GCO	66
3.2.3. Obtención de extractos aromáticos representativos	69
3.2.3.1. Microextracción en fase sólida	70
3.2.3.2. Extracción directa con disolvente- <i>High-Vacuum Transfer</i>	79
3.3. La GCO en el análisis del aroma de los alimentos	88
3.3.1. Caracterización del aroma	89
3.3.2. Determinación de compuestos impacto	90
3.3.3. Determinación de <i>off-flavours</i>	92
3.3.4. Correlación entre la GCO y el análisis sensorial tradicional	93
3.3.5. Control de calidad	94
Bibliografía	98
<i>* La cromatografía de gases con detector olfatimétrico: una herramienta esencial para el análisis del aroma de bebidas alcohólicas</i>	109
<b>CAPÍTULO 4: El vinagre de vino con DOP “Vinagre de Jerez”</b>	<b>143</b>
4.1. El vinagre	145
4.1.1. Definición	145
4.1.2. Tipos de vinagre	146
4.1.3. Métodos de elaboración de vinagre de vino	147
4.1.3.1. Métodos de acetificación con cultivo sumergido o métodos rápidos	148
4.1.3.2. Métodos de acetificación con cultivo superficial o métodos lentos	149

4.2. El vinagre de Jerez	151
4.3. El aroma del vinagre de Jerez	156
Bibliografía	159
<i>* Chemical characterization of comercial Sherry vinegar aroma by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry</i>	163
<b>CAPÍTULO 5: Los pistachos tostados</b>	<b>187</b>
5.1. Los frutos secos	189
5.1.1. Definición	189
5.1.2. Tipos de frutos secos	190
5.1.3. Procesado de los frutos secos	191
5.1.3.1. Recolección	192
5.1.3.2. Conservación	193
5.1.3.3. Elaboración	194
5.1.3.4. Envasado	195
5.1.4. Composición química	196
5.1.5. Efectos funcionales de los frutos secos	197
5.2. Los pistachos	198
5.3. El aroma de los pistachos tostados	199
Bibliografía	203
<i>* Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachios</i>	209
<i>* Determination of roasted pistachios (Pistacia vera L.) key odorants by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry</i>	231
<b>CAPÍTULO 6: El aceite de oliva</b>	<b>251</b>
6.1. El aceite de oliva	253
6.1.1. Definición	253

6.1.2.	Tipos de aceite de oliva	254
6.1.3.	Métodos de obtención del aceite de oliva	256
6.1.3.1.	Obtención de los aceites de oliva vírgenes	257
6.1.3.2.	Obtención del aceite de orujo bruto	259
6.1.3.3.	Obtención del aceite de oliva y del aceite de orujo refinados	259
6.1.3.4.	Obtención del aceite de oliva y del aceite de orujo de oliva	260
6.2.	El aceite de oliva virgen	260
6.2.1.	Composición química	260
6.2.2.	Criterios de calidad	263
6.2.2.1.	Parámetros químicos	263
6.2.2.2.	Evaluación sensorial	265
6.2.3.	Efectos funcionales del aceite de oliva	267
6.3.	El aroma del aceite de oliva virgen	268
	Bibliografía	271
	<i>* Evolution of olive oil aroma and oxidation status over time under different atmospheres</i>	275
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>299</b>
	<b>CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS</b>	<b>305</b>

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

**OBJETIVOS**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

El aroma que presenta un alimento es uno de sus más importantes factores de calidad. En la práctica totalidad de los casos, el olor que un producto alimenticio emite es el responsable directo de la buena o mala primera impresión que causa en el consumidor. Incluso en ciertos alimentos, aquéllos cuyo consumo está estrechamente ligado al placer que proporciona su degustación, su influencia es aún mayor, debido al destacado papel que desempeñan las propiedades organolépticas.

Actualmente, es fundamental conocer en profundidad todos los aspectos relacionados con el aroma de los alimentos para garantizar una calidad óptima y poder desarrollar en el futuro productos aún mejores, adecuados a los gustos de los consumidores a quienes vaya destinado. Por este motivo, el análisis de la composición aromática de los alimentos constituye uno de los principales retos de la industria e investigación alimentarias.

El aroma está constituido por numerosos compuestos volátiles, y dada la complejidad de las matrices alimenticias y las peculiaridades de los analitos a estudiar, la cromatografía de gases se muestra como la técnica de análisis más adecuada. Sin embargo, sólo una parte de estos volátiles presentan olor y realmente contribuyen al aroma, al mismo tiempo que la valoración de las cualidades aromáticas tan solo puede realizarse empleando la nariz humana. De ahí que sea la cromatografía de gases con detección olfatométrica la única técnica que permite llevarlo a cabo.

A partir de estas premisas, los objetivos que se propone abordar esta tesis doctoral son los siguientes:

- 1.- Caracterizar el aroma de tres alimentos distintos (el vinagre de vino, los pistachos tostados y el aceite de oliva) mediante el empleo de la cromatografía de gases-olfatometría.
- 2.- Comprobar la eficacia de dos técnicas de extracción y concentración de volátiles (la microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza y la extracción directa con disolventes seguida de *high-vacuum transfer*) en la

obtención de extractos aromáticos representativos de los alimentos estudiados, aptos para el análisis mediante la cromatografía de gases-olfatometría.

- 3.- Comprobar la utilidad de la cromatografía de gases-olfatometría como técnica para evaluar la evolución de la calidad sensorial de los alimentos.

# CAPÍTULO

# 1

## Presentación





APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

El olfato es el primero de los cinco sentidos que el ser humano desarrolla en el seno materno. De hecho, las estructuras que dan lugar al sistema olfativo comienzan a formarse ya al final del primer mes de gestación. También es el sentido más evolucionado en el momento del nacimiento [1]. Sin embargo, a medida que crecemos y que nuestros otros sentidos se perfeccionan, estos últimos ganan en importancia, relegando al olfato a un segundo plano. De la misma manera, nuestro olfato también ha ido perdiendo funciones y capacidades en comparación con el de los demás mamíferos a lo largo de la evolución humana: ya no es indispensable para nuestra supervivencia, no es esencial para preservar nuestro organismo ni la especie.

La sociedad actual en la que vivimos ha sustituido parte de la información que nuestros antepasados recibían gracias al olfato por otro tipo de información, percibida a través del resto de los sentidos. Ahora ya no existen depredadores de los que haya que huir al detectar su presencia por el olor que emiten. Como tampoco es necesario oler los alimentos para comprobar su salubridad, valor nutricional y calidad organoléptica, sino que, en la mayoría de los casos, es suficiente con leer las etiquetas que los acompañan [2].

Pero aún hoy en día, el olfato sigue siendo importante, fundamental en algunos aspectos de nuestra vida. Es el único sentido capaz de modificar nuestro comportamiento, de alterar nuestro estado de ánimo o de provocar reacciones fisiológicas inmediatas en nuestro organismo de forma directa. Además, se encuentra estrechamente relacionado con las zonas cerebrales que controlan y regulan la memoria y las emociones, por lo que permite traer a nuestra mente recuerdos y sensaciones instantánea e incontroladamente al detectar un determinado olor. Y sin él, la comida no tiene ningún sabor.

Por todo ello, no es de extrañar que el olor que presenta un alimento constituya un factor de calidad básico. De él depende en gran medida la aceptación o el rechazo del producto por parte del consumidor. En consecuencia, si en un futuro se quieren mejorar los productos alimenticios para ofertar otros de mayor calidad,

organolépticamente buenos, y que satisfagan las demandas de los consumidores, se requieren estudios en profundidad sobre el aroma de estos alimentos: qué odorantes lo constituyen y qué notas aromáticas proporcionan, cuál es su procedencia y evolución a lo largo de la vida útil del producto, en qué concentraciones aparecen y cómo interactúan con el resto de componentes, etc. Además, existen distintos alimentos que se consumen, no por su aporte nutritivo, sino por el placer que proporciona su degustación, como ocurre, por ejemplo, con el vino. En estos casos, las propiedades organolépticas de los productos, entre las que se encuentra el aroma, juegan un papel esencial.

Pero analizar el aroma no es una tarea sencilla. Lo constituyen centenares de compuestos volátiles, cada uno con unas propiedades químicas y aromáticas diferentes, además de presentar en cada caso una contribución al aroma específica y distinta. Y no se debe olvidar el amplio rango de concentraciones en las que aparecen y que es necesario considerar, ni tampoco el efecto de la matriz del alimento que los contiene. Sin embargo, existen diversas técnicas analíticas que, aunque con limitaciones, son capaces de proporcionar información muy útil y valiosa acerca del aroma.

Las técnicas cromatográficas, y más concretamente, la cromatografía de gases, son las más adecuadas cuando se pretende estudiar la fracción aromática de un producto. Gracias a ellas es posible averiguar qué compuestos químicos integran dicha fracción y en qué concentraciones. Y, de entre todas las técnicas cromatográficas, hay que destacar la cromatografía de gases con detección olfatométrica (GCO), en la que se emplea la nariz humana como detector cromatográfico en paralelo con otro detector [3]. De esta manera se combinan respuesta instrumental y sensorial, lo que permite identificar los compuestos volátiles que presentan olor de entre la totalidad de la fracción volátil de una muestra. Además, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes metodologías con el objetivo de evaluar la contribución de cada odorante en el aroma global del producto

estudiado, las denominadas técnicas olfatométricas. Todo ello convierte a la GCO en una herramienta imprescindible en el estudio del aroma.

Sin embargo, es necesario obtener un extracto aromático representativo del producto a analizar antes de llevar a cabo el análisis cromatográfico. El pretratamiento de las muestras es un paso crítico en toda investigación aromática, por lo que supone un importante reto para quienes se dedican a ella. A lo largo de los últimos años se han producido mejoras en los métodos clásicos de extracción y concentración y han aparecido nuevas técnicas de pretratamiento. Pero, a pesar de estos avances, todavía no existe un único método ideal para la obtención de un extracto aromático representativo, sea cual sea la muestra que se quiera analizar o la finalidad que se persiga.

El grupo de Química Analítica Enológica y de los Alimentos de la Universidad Rovira i Virgili (URV), donde se ha desarrollado esta tesis doctoral, ha trabajado en varias líneas de investigación dedicadas al estudio del aroma del vino desde distintos puntos de vista. Así, si bien en sus inicios el objetivo se centró en el análisis químico de diversas familias de compuestos con una importante contribución a su aroma [4-6], a lo largo del tiempo el objetivo se concretó en el estudio y caracterización del aroma del vino de distintas variedades [7], gracias a la aplicación de la GCO, con muy buenos resultados. Por ese motivo, cuando se planteó el desarrollo de la presente tesis doctoral, se creyó interesante ampliar el análisis del aroma a otros productos alimenticios, pero siempre mediante el uso de la GCO. Inicialmente, el trabajo de investigación se dirigió hacia el estudio del aroma del vinagre de vino, dada su vinculación con el vino. Posteriormente, y debido al interés mostrado por algunas empresas del sector alimentario, los estudios se extendieron a otros productos, como los pistachos tostados y el aceite de oliva virgen.

La memoria de esta tesis doctoral está estructurada de forma que en ella se han incluido los artículos derivados de la experimentación realizada. Cada capítulo, a excepción del capítulo 2, presenta una primera parte donde se introduce y detalla el

tema a tratar. A continuación se exponen las publicaciones a las que ha dado lugar la investigación. En cuanto a la memoria en general, está dividida en dos partes.

La primera parte, que engloba los capítulos 2 y 3, está enfocada a proporcionar una visión general del aroma y de la técnica cromatográfica empleada en su análisis. En el capítulo 2 se describe cómo se produce la percepción sensorial del aroma en los seres humanos, así como los aspectos que lo definen y que hay que tener en cuenta cuando se trabaja con él. Asimismo, se hace referencia a las distintas formas de analizarlo con las que se cuenta actualmente. El capítulo 3 se centra en la cromatografía de gases-olfatometría, sus características y aplicaciones en el análisis del aroma de los alimentos. En él también se detallan las dos técnicas de pretratamiento de muestra que se han utilizado durante el desarrollo del trabajo experimental.

La segunda parte incluye los capítulos 4, 5 y 6, cada uno de ellos dedicado a uno de los productos alimenticios estudiados [8-10]. El capítulo 4 trata sobre el aroma del vinagre de vino comercial elaborado bajo la Denominación de Origen Protegida (DOP) “Vinagre de Jerez”. En el artículo que se adjunta al final del mismo y que está enviado para su publicación, se caracterizan y cuantifican los compuestos implicados en el aroma de este tipo de vinagre, los cuales se extraen y concentran mediante la microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza (HS-SPME). También se determinan los umbrales de percepción para estos odorantes en una matriz hidroacética, similar a la del vinagre. De esta manera se establece una primera aproximación a la importancia sensorial que presenta cada uno de estos compuestos en el aroma del producto final.

En el capítulo 5, cuyo objeto de estudio es el aroma de los pistachos tostados, se incluyen dos artículos, uno ya publicado y otro, aceptado para su publicación en el momento de redactar esta memoria. En el primero de ellos se realiza un estudio comparativo de dos técnicas de extracción y concentración de volátiles: la HS-SPME y la extracción directa con disolventes (DSE) seguida de *high-vacuum transfer* (HVT).

Ambas técnicas se aplican sobre la misma variedad de pistachos tostados, y los extractos obtenidos se analizan mediante GCO. Aunque las dos técnicas proporcionan resultados similares y demuestran ser eficaces extrayendo los odorantes de este tipo de frutos secos, la SPME, que es más rápida y limpia, permite detectar un mayor número de regiones aromáticamente activas. Además, estas regiones se perciben hasta factores de dilución más altos. Por ese motivo, para la siguiente parte del estudio se decidió utilizar la SPME como técnica de extracción y concentración.

En el artículo derivado de esta segunda fase de la investigación se caracterizan los compuestos responsables del aroma de dos variedades distintas de pistachos. La técnica olfatométrica de dilución empleada, el AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*) permite una primera jerarquización de los odorantes. La comparación de los resultados olfatométricos obtenidos para cada variedad demuestra que una de ellas tiene un perfil aromático más rico que la otra, resultados que corrobora el análisis sensorial descriptivo que se lleva a cabo.

Por último, el capítulo 6 de la memoria se centra en el análisis de la evolución natural del aroma del aceite de oliva virgen embotellado bajo tres atmósferas diferentes: aire, nitrógeno y argón. El periodo de tiempo elegido (un año) corresponde con la vida útil habitual del aceite. Para lograr una oxidación natural, no se aplican altas temperaturas ni se modifican las condiciones de almacenamiento, de manera que éstas coinciden con las que usualmente soporta el producto que se consume en los hogares. Además del análisis olfatométrico del aroma del aceite, también se hace un seguimiento de su oxidación mediante la determinación de ciertos parámetros que establece la actual legislación. Gracias a este estudio se ha podido concluir que el aceite de oliva virgen embotellado con aire pierde parte de su calidad organoléptica antes que el aceite embotellado bajo algún tipo de atmósfera protectora, aunque era algo previsible. Sin embargo, lo que se ha demostrado al aplicar la GCO en el análisis del aroma del aceite es que la pérdida de calidad en realidad se produce antes de lo que indican los parámetros químicos. Esto viene a

corroborar la mayor sensibilidad del análisis sensorial. El artículo en el que se explica toda la investigación está enviado para su publicación.

Finalmente, en las últimas páginas se recogen las conclusiones fruto de los resultados obtenidos a lo largo de toda la experimentación. En ellas se plantean nuevas cuestiones que podrían ser el origen de futuros trabajos de investigación en el campo del análisis del aroma de los alimentos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fisher, C., Scott, T. R. *Flavores de los alimentos. Biología y química*. Zaragoza: Acribia, S. A.; 1997.
- [2] Holley, A. *El cerebro goloso*. 1ª edición. Barcelona: Rubes Editorial, S. L.; 2006.
- [3] Mayol, A. R., Acree, T. E. Advances in gas chromatography-olfactometry. En: Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T. E., editors. *Gas chromatography-olfactometry. The state of the art*. Washington: American Chemical Society; 2001, p. 1-10.
- [4] Mestres, M., Sala, C., Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma. *J. Chromatogr. A* 1999; 835: 137-144.
- [5] Sala, C., Mestres, M., Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* 2002; 953: 1-6.
- [6] Riu, M., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloranisole in wines. *J. Chromatogr. A* 2007; 1138: 18-25.
- [7] Martí, M. P., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7861-7865.
- [8] Llaguno, C., Polo, M. C., coordinadoras. *El vinagre de vino*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991.
- [9] Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005.
- [10] Mataix Verdú, J., Barbancho Cisneros, F. J. *El aceite de olive, alma del mediterráneo*. Jaén: Instituto de Estudios Giennenses (Diputación de Jaén), Universidad de Jaén (Servicio de Publicaciones); 2008.



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

# CAPÍTULO 2

## El aroma



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## 2.1.- LA PERCEPCIÓN SENSORIAL

Gracias a los sentidos percibimos el mundo que nos rodea. La vista, el oído, el tacto, el gusto y el olfato nos permiten recibir, seleccionar, organizar e interpretar la información que produce nuestro entorno y que nos llega a través de distintos estímulos.

Los sentidos del olfato y el gusto constituyen los denominados sentidos químicos, ya que resultan de la interacción directa de ciertos compuestos químicos con nuestros sistemas receptores periféricos: el epitelio olfatorio localizado en la nariz y los botones gustativos que se encuentran en la lengua [1]. Ambos son los más primitivos de nuestros sistemas sensoriales, con una historia evolutiva de 500 millones de años, y directamente relacionados con las necesidades básicas del ser humano: la alimentación y la detección de peligros, cuyo objetivo es preservar el organismo, y la reproducción, encaminada a preservar la especie [2-4], funciones controladas por la región más primitiva de nuestro cerebro, aquella que compartimos con los reptiles y que se denomina “cerebro reptiliano”. En el caso del olfato, éste fue el único sentido que quedó directamente conectado con la siguiente fase evolutiva de nuestro cerebro, la que empezó a regular las emociones, el aprendizaje y la memoria, y que se ha dado en llamar cerebro emocional o “sistema límbico”, y gracias a la cual generamos los mecanismos de identificación. Posteriormente, los humanos desarrollamos un nuevo estrato cerebral, capaz de interactuar con las partes emocionales y de integrar y procesar lo registrado por los sentidos [5].

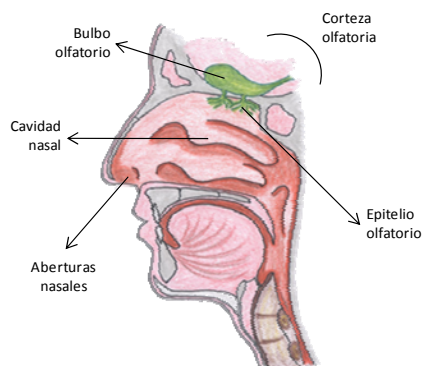
Así, el olfato está ligado a la parte de nuestro cerebro que controla la memoria y las emociones, de forma que, frecuentemente, memoria, emoción y olor se encuentran interrelacionados [3, 6]. Esto hace que, al percibir un determinado estímulo oloroso, nuestra mente se traslade a aquella situación que nosotros asociamos con él, de manera que somos capaces de sentir lo que sentiríamos si realmente nos encontrásemos en dicho contexto.

Por su parte, el sentido del gusto está íntimamente relacionado con las consecuencias internas de la digestión, siendo el responsable, ya desde la infancia, de nuestras preferencias por los sabores asociados a la nutrición y de nuestro rechazo visceral a aquellos sabores que nos hayan provocado náuseas en alguna ocasión [2].

Finalmente, los sentidos del olfato y el gusto se encuentran estrechamente conectados entre sí, llegándose a confundir en ocasiones cuál de ellos recibe realmente el estímulo químico que los desencadena. Ambos sentidos intervienen conjuntamente en la apreciación global de los alimentos y en la evaluación de su calidad, actuando de manera decisiva en la elección que hace el consumidor.

### 2.1.1.- Anatomía del olfato

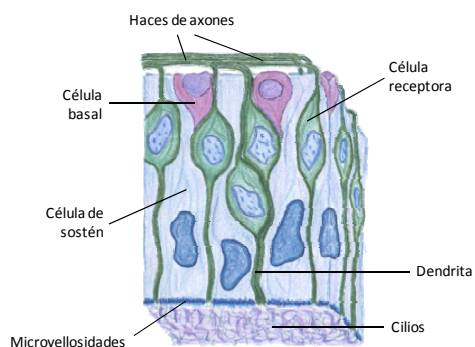
El sistema olfatorio del ser humano está compuesto por tres regiones claramente diferenciadas: la cavidad nasal, donde se localiza el epitelio olfatorio con sus correspondientes receptores olfatorios, el bulbo olfatorio y la corteza olfatoria [1-3, 7] (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1.** Esquema del sistema olfatorio humano

El *epitelio olfatorio* se sitúa a lo largo de la parte superior de la cavidad nasal, está cubierto por la denominada mucosa olfatoria y constituye el tejido receptor donde se fijan las moléculas que presentan olor. En él encontramos tres tipos de células: las receptoras, las de sostén y las basales (**Figura 2.2**).

Se estima que existen unos 6 millones de células receptoras en cada fosa nasal humana, con una vida media de entre uno y dos meses [8]. Estas neuronas receptoras, aunque pequeñas, presentan largas dendritas que consiguen contactar con el exterior, donde forman unos botones. De estos botones salen numerosos cilios, los cuales se dispersan por la cara más externa del tejido receptor, y cuya superficie está sembrada de partículas que se consideran realmente los receptores donde se fijan los odorantes. Por otro lado, desde la cara basal de las células receptoras parten los axones, los cuales se agrupan en haces al abandonar el epitelio olfatorio, uniéndose para formar nervios que se distribuyen por la superficie del bulbo olfatorio.

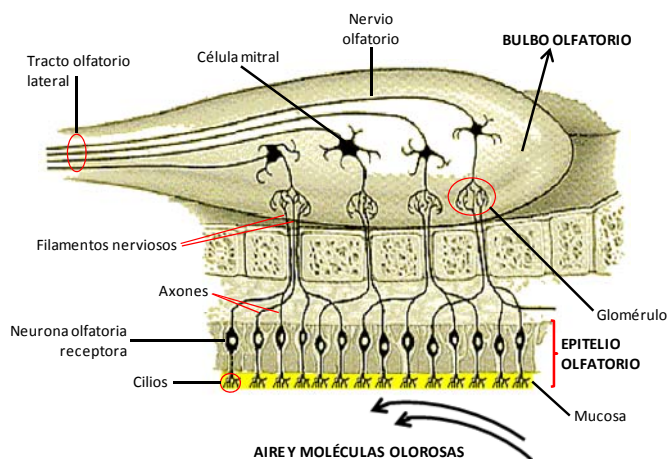


**Figura 2.2.** Células del epitelio olfatorio humano

Las células de sostén o sustentaculares son las mayoritarias en el epitelio olfatorio, ocupando casi un tercio del mismo. Se encargan de separar las células receptoras entre sí y de regular la microcomposición de la mucosa, así como de desactivar odorantes y de proteger al epitelio de los agentes externos. Aunque no tienen cilios, sí presentan numerosas microvellosidades que se sumergen en la mucosa. Por su parte, las células basales son las que dan lugar a los otros dos tipos de células cuando el epitelio olfatorio se daña.

El *bulbo olfatorio* es una proyección frontal del cerebro que constituye un complejo centro neuronal donde las señales sensoriales se filtran y modifican. En él actúan cinco tipos distintos de neuronas: dos de ellas (las células mitrales y las células

en penacho) reciben información del epitelio que luego envían hacia la corteza, mientras que las otras tres median en interacciones locales. En el bulbo convergen los nervios procedentes del epitelio olfatorio, los cuales terminan en los denominados glomérulos donde se producen las principales interacciones entre esos nervios y las células mitrales y en penacho, y la modulación de dichas interacciones mediante complejos circuitos locales (**Figura 2.3**) [7, 9].



**Figura 2.3.** Anatomía del epitelio, el bulbo y el tracto olfatorios en el ser humano

A continuación, los axones de las neuronas de proyección del bulbo forman el tracto olfatorio lateral, el cual conecta directamente con las distintas estructuras de la corteza olfatoria primaria (el núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme, el tubérculo olfatorio, la amígdala y el córtex entorrinal temporal). Estas estructuras están relacionadas entre sí y con otras partes cerebrales, entre las que se incluye el hipocampo, que juega un papel importante en la formación de nuevos recuerdos y en la percepción espacial.

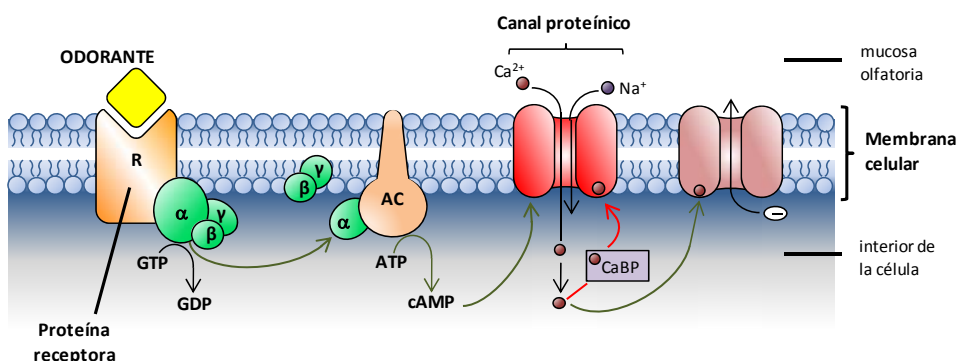
### 2.1.2.- Fisiología del olfato

El proceso por el cual un estímulo químico (un odorante o molécula olorosa) se convierte en una señal eléctrica que se transmite al cerebro tiene lugar en la

superficie de los cilios del epitelio olfatorio [7, 9, 10]. Es lo que se conoce como *transducción*.

Para que la cascada de actividad enzimática que constituye la transducción se desencadene, primero es necesario que los odorantes atraviesen la cavidad nasal y alcancen la mucosa olfatoria, de ahí que la mayoría sean partículas volátiles e hidrofóbicas. A continuación, una vez que llegan a dicha mucosa, deben disolverse en el mucus y atravesarlo para acceder a la superficie de los cilios.

De acuerdo con la **Figura 2.4**, en las membranas de estos cilios encontramos distintas proteínas receptoras (R) a las cuales se fijan las moléculas olorosas, lo que activa las proteínas fijadoras de guanidín-trifosfato (GTP) (representadas en el dibujo por la letra “ $\alpha$ ”, aunque las específicas del sistema olfatorio se denominan  $G_{olf}$ ), que actúan como mediadoras en la activación de la adenilato ciclasa (AC) y cuya función es amplificar los efectos de la transducción. El acoplamiento de una única molécula olorosa a los receptores activa cientos de proteínas  $G_{olf}$ , las cuales, al unirse a la AC, permiten la reducción del adenosín trifosfato (ATP) a adenosín 3', 5'-monofostato cíclico (cAMP, en inglés).



**Figura 2.4.** Esquema del proceso de transducción mediado por segundo mensajero en los cilios de las células receptoras olfatorias

Las moléculas de cAMP actúan directamente sobre la membrana celular cambiando la estructura de los canales proteínicos, de manera que los cationes de



sodio y calcio ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) pueden pasar de la mucosa olfatoria al interior de la célula. Como resultado, se genera un potencial de membrana negativo que tiende a moverse hacia valores más positivos, lo que crea los potenciales de acción, los cuales son conducidos hasta el cerebro a través de los axones de las células receptoras.

Todo este proceso se conoce como sistema de segundo mensajero, donde el cAMP es el segundo mensajero y las  $G_{\text{olf}}$  y la AC son los intermediarios que permiten su acción [2]. Este sistema ha sido estudiado y analizado en profundidad, al igual que la familia de genes que codifica los receptores olfatorios, y cuya importancia científica es tal, que los investigadores que en 1991 descubrieron la existencia de dichos genes, Linda Buck y Richard Axel [11], fueron galardonados en 2004 con el Nobel de medicina por ello.

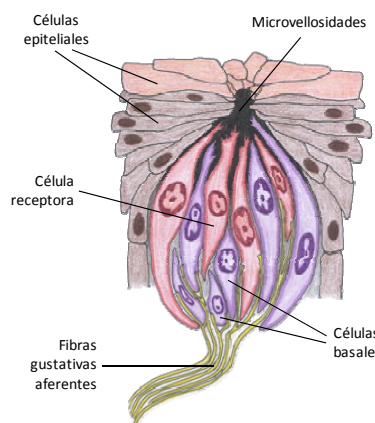
En cuanto a la capacidad olfativa, son muchos los factores que influyen en ella: el género, la edad, la contaminación, el hecho de ser fumador, el estado reproductivo, etc., e incluso se están llevando a cabo estudios en los que se relacionan algunas enfermedades degenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson, con un descenso de la función olfativa [3]. Dentro de este ámbito también merecen una mención especial las denominadas “anosmias”, las cuales implican la incapacidad de algunos individuos para detectar ciertos odorantes o familias de olores, aunque no hayan perdido en modo alguno su capacidad olfativa.

### **2.1.3.- Anatomía del gusto**

En el sistema olfatorio, la información llega al cerebro desde la parte frontal del mismo y de manera aislada, mientras que la información que proporciona el sistema gustativo llega al cerebro desde su parte posterior y, además, acompañada por sensaciones táctiles.

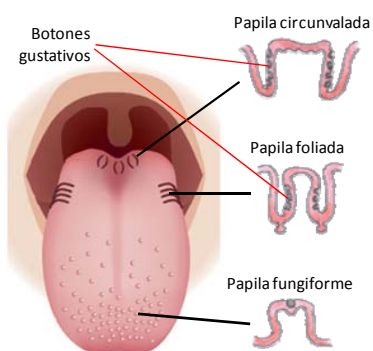
En el ser humano, el sistema gustativo está localizado fundamentalmente en la lengua, donde sus receptores se agrupan en botones gustativos, estructuras en forma de copa situadas en pequeñas elevaciones de la lengua denominadas papilas.

Cada botón gustativo está constituido por cuatro tipos distintos de células: las células basales (que generan las neuronas receptoras), las células oscuras (tipo I), las intermedias y las claras (tipo II). Estas tres últimas son células receptoras en distintos grados de desarrollo [2, 7] (**Figura 2.5**), que se extienden desde la base del botón hasta la superficie de la lengua, donde proyectan finas microvellosidades a través del poro gustativo para explorar el ambiente.



**Figura 2.5.** Corte transversal de un botón gustativo

Aunque existen botones en el paladar blando, la laringe, la faringe y la epiglotis, la mayoría se encuentran en la lengua, agrupados en papilas, las cuales se dividen en tres tipos (**Figura 2.6**):



**Figura 2.6.** Distribución y tipos de papilas gustativas

- las papilas circunvaladas, situadas en la parte posterior de la lengua;
- las papilas foliadas, localizadas a lo largo de los bordes laterales de la lengua en forma de cinco o seis pliegues verticales en la superficie del epitelio;
- y las papilas fungiformes, que cubren los dos tercios anteriores de la lengua.

Mediante las fibras gustativas aferentes (**Figura 2.5**), la información recogida por las células receptoras es enviada a través de distintos nervios hasta el denominado núcleo del tracto solitario (NTS), donde también llega información procedente del

sistema digestivo. Mientras que un pequeño porcentaje de las células gustativas del NTS se proyecta hacia áreas superiores del cerebro, el resto forma conexiones dentro del NTS, pasando a controlar los reflejos fijos y primitivos de aceptación y rechazo de la comida o activando reflejos pancreáticos y gastrointestinales. Otras fibras se proyectan hacia la parte delantera del cerebro, llegando a distintas zonas de la corteza gustativa, entre las que se encuentra la amígdala, la cual está relacionada con el hipocampo, como ya se ha mencionado en el sistema olfatorio.

De esta manera, el gusto, además de determinar qué sustancias se ingieren, es capaz de comunicar dimensiones hedónicas, de activar procesos digestivos y de influir en los aspectos motivacionales de la alimentación.

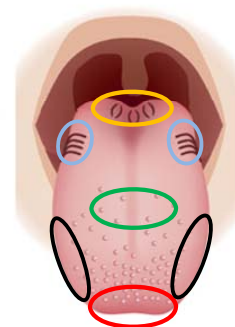
#### **2.1.4.- Fisiología del gusto**

Al contrario de lo que ocurre en el olfato, los estímulos gustativos son principalmente solubles en agua y no volátiles, de manera que se liberan durante la masticación, llegando a los receptores a través de la saliva. Estos receptores gustativos se encuentran en las microvellosidades de las células receptoras de la lengua en forma de canales de iones o de proteínas receptoras especializadas [2, 7], y la interacción de las sustancias sápidas con ellos provoca cambios en la conductancia de la membrana y una despolarización celular. Esta despolarización es transmitida pasivamente desde la zona superior hasta la inferior de la célula gustativa, donde ésta inicia un potencial de acción en el nervio, que será lo que producirá la percepción.

Los procesos de recepción y transducción en el sentido del gusto varían en función de la molécula que produce el estímulo, de forma que los estímulos salado y ácido interactúan directamente con los canales iónicos de las microvellosidades. Sin embargo, el estímulo dulce, los compuestos amargos y los aminoácidos (que proporcionan estímulos dulces, amargos y umami) requieren proteínas receptoras específicas. En este segundo caso se emplean proteínas fijadoras de GTP y segundos mensajeros, como en el olfato [2, 7, 12, 13].

Tradicionalmente se ha creído que cada uno de los cinco sabores básicos que existen (dulce, salado, ácido, amargo y umami) únicamente podía percibirse en un área específica de la lengua [14]. En realidad, los humanos podemos percibir cualquier sabor en cualquier área de la lengua que presente papilas. Únicamente varía la intensidad del sabor según la región lingual y el tipo de papila que exista en ella [7, 12, 13] (**Figura 2.7**).

De esta manera, el **dulce** se percibe mejor en la punta de la lengua mientras que el **amargo** lo hace en la parte posterior, el **umami**, en la central y el **ácido** y el **salado** en los laterales posteriores y delanteros de la lengua, respectivamente.



**Figura 2.7.** Distintas zonas linguales

## 2.2.- EL AROMA

Cuando se pierde el olfato tras un traumatismo craneal o por una afección de las vías respiratorias, los alimentos dejan de tener sabor. Ésta es la evidencia más clara de que los sentidos del olfato y el gusto están íntimamente relacionados, tanto, que a veces resulta difícil saber quién recibe el estímulo cuando se ingiere un alimento. Y es que los alimentos tienen olor, que percibimos cuando los vapores aromáticos que emiten se introducen por las fosas nasales al acercárnoslos a la boca (vía nasal directa). Pero, una vez en la cavidad bucal, dichos alimentos presentan más olor si cabe, ya que la masticación libera muchas moléculas volátiles, las cuales van por detrás de la boca hasta llegar a la cavidad nasal (vía retronasal). A menudo, al olor generado por estas moléculas que llegan hasta la mucosa olfativa, a contracorriente del aire inhalado durante la respiración, se le denomina *aroma* [7].

En realidad, cuando se ingiere un alimento, las interacciones del mismo con los receptores del olfato y del gusto, junto con la textura que presenta, producen una sensación conjunta y global que se ha venido a definir con la palabra “*flavor*” [15]. De esta manera, el *flavor* se debe a tres sensaciones:

- las gustativas, que, como se ha visto en el apartado 2.1.4, son cinco (salada, dulce, ácida, amarga y umami) y se perciben en la boca;
- las olfativas, que, a diferencia de las anteriores, son infinitamente variadas y complejas, percibiéndose en la nariz en concentraciones extremadamente bajas [10] (tradicionalmente se ha manejado la cifra de 10.000 olores que el ser humano es capaz de distinguir [16]);
- y las trigeminales, que se producen por la acción de bebidas y alimentos en las terminaciones del nervio craneal número 5, el nervio trigémino, relacionado tanto con la nariz como con la boca y cuyos receptores táctiles, del dolor y de la temperatura reciben las sensaciones de picor, astringencia y frío [7, 9].

De este modo, el *flavor* de un alimento constituye una de las principales propiedades sensoriales que los consumidores valoran a la hora de seleccionar, aceptar/rechazar e ingerir un producto, ya que los sentidos que nos permiten percibirlo están estrechamente relacionados con nuestro sistema digestivo y los centros neuronales de los recuerdos y las emociones.

### **2.2.1.- Clasificación de los olores**

Así como existe un número limitado de sabores, la diversidad de olores es enorme, de ahí la complejidad a la hora de clasificarlos. A esto se le une el que no contemos con un lenguaje verbal bien codificado, porque, aunque hay palabras que definen los olores considerados básicos (mentolado, floral, pútrido, etc.), en realidad, éstas son muy pocas. La mayoría de las veces es necesario recurrir a cualidades de otros ámbitos, como el origen, la sensación que se produce en otros sentidos y/o

cualquier otro criterio cultural (verde, fresco, dulce, etc.), para describir los olores percibidos.

Estas dificultades, sin embargo, no han impedido que se haya intentado clasificar los olores. Ya en el siglo XVIII, Linneo establecía 7 categorías para ellos: *aromáticos* (los del laurel), *fragantes* (de la tila, el lis y el jazmín), *ambrosianos* (del ámbar y el almizcle), *aliáceos* (del ajo), *caprílicos* u olor de macho cabrío (los olores de algunos ácidos grasos de cadena corta), *narcóticos* (de las solanáceas) y *fétidos* (de las plantas pútridas) [7]. Y éstas inspiraron en el siglo siguiente a H. Zwaardemaker [17] para proponer una nueva lista con nueve categorías: las previamente descritas más la de los olores *etéreos* (de las frutas muy maduras) y los *empireumáticos* (del café y el pan tostados, y el tabaco).

Pero cuando se trata de clasificar olores, quizá sea más útil emplear la *teoría de los prototipos*, desarrollada por Eleanor Rosch [18]. Según esta teoría, las categorías se construyen alrededor de un ejemplar considerado como el mejor representante de dicha categoría y denominado *prototipo*. El resto de ejemplares se distribuyen alrededor del prototipo según su grado de semejanza con él, y el conjunto presenta un *parecido de familia*. De esta manera, el aroma de manzana representaría un nivel base, por el encima del cual estaría el nivel superior de aroma de fruta y, en un nivel subordinado, el olor de la manzana golden [7].

De todos modos existen sectores en los que el aroma juega un papel fundamental y donde se han conseguido establecer clasificaciones y terminologías adecuadas y específicas para facilitar la comunicación entre los profesionales que trabajan en ellos. Es el caso de la Rueda de los Gustos de la Cerveza, creada en la década de los 70 por Morten Meilgaard [19] y en la que se utilizan catorce categorías y cuarenta y cuatro términos sensoriales para describir el olor y el sabor de cualquier estilo de cerveza. O el de la Rueda de los Aromas del Vino, creada en 1984 por Ann C. Noble y sus colaboradores [20] y modificada y ampliada en 1987 [21], la cual está

inspirada en la rueda de la cerveza, y en la que aparecen doce categorías y noventa y cuatro descriptores (Figura 2.8).

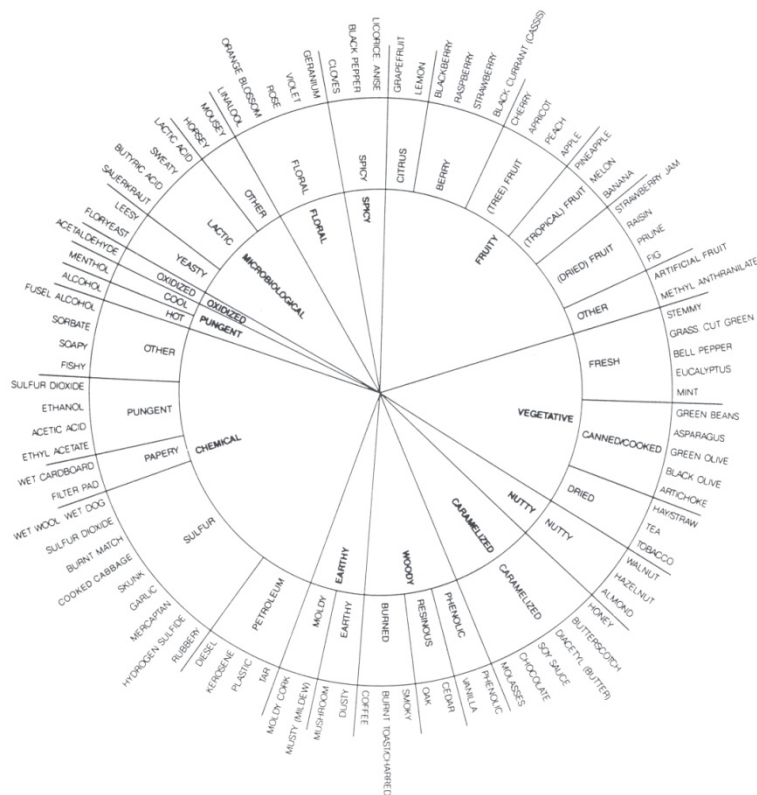


Figura 2.8. Rueda de los Aromas del Vino: descriptores sensoriales utilizados para el vino [21]

Dado que las ruedas de los olores organizan los olores específicos de los productos utilizando unas pocas categorías fácilmente reconocibles, en la actualidad existen ruedas de olores y sabores de prácticamente cualquier producto: el chocolate suizo, el brandi sudafricano, el queso, la miel monofloral, etc. [16].

### 2.2.2.- Relación estructura-olor

Como ya se ha explicado en el apartado 2.1.3, para que se produzca la activación de la cascada enzimática que origina el que nuestro cerebro perciba un estímulo químico como un olor, es necesario que la molécula olorosa se fije a una proteína

receptora. Cada ser humano tiene un elevado número de receptores olfativos sumamente diversos. Sin embargo, nuestro sistema olfatorio presenta un amplio poder de discriminación: es capaz de detectar un inmenso espectro de odorantes, y ello gracias a la selectividad de sus receptores [7].

Esta selectividad se traduce en que las moléculas olorosas no sólo deben tener un grupo osmóforo (un grupo funcional activo), sino que además deben presentar una geometría adecuada que permita activar un receptor si encuentra en él una región con la que intercambiar enlaces de baja energía. De esta manera, estudios con compuestos alifáticos de distintas longitudes de cadena han demostrado que la discriminación de la unión ligando-receptor es tan buena, que un solo receptor llega a distinguir entre compuestos químicos que se diferencian únicamente en un átomo de carbono en la longitud de la cadena alifática, o entre compuestos que presentan la misma cadena, pero que se diferencian en el grupo funcional [10, 15, 22].

Por este motivo, dos moléculas enantioméricas pueden presentar olores diferentes, como ocurre en el caso del butanoato de 2-pentilo, cuyos enantiómeros se perciben como “frutal y dulce” y “ahumado y especiado” [23, 24]. El componente estructural es el que se impone en la detección de este olor. En cambio, para moléculas con una configuración estérica prácticamente igual, caso del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y del sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), los olores extremadamente intensos y diferentes que presentan ambos están ligados a la presencia de distintos grupos funcionales. Es decir, que dependiendo del odorante de que se trate será su grupo osmóforo o su geometría quien influya mayoritariamente en el aroma finalmente percibido [1].

### **2.2.3.- Dimensión de los olores**

El que detectemos un compuesto como un determinado olor no sólo depende de su estructura, sino que también existen otros factores que influyen en la percepción, y



a los que se les considera las tres dimensiones de la sensibilidad aromática: su intensidad, su cualidad y su valor hedónico [7, 15].

Cuando se habla de *intensidad de un aroma* hacemos referencia a la cantidad de odorante que se necesita en el entorno de las células receptoras de la mucosa olfatoria para que se produzca la activación del olfato. Cuando se trata de la concentración de odorante más baja en la que éste es detectado, hablamos del umbral de percepción. Si, además de detectarlo, el olor que se genera se puede identificar, ese nivel de concentración es el umbral de reconocimiento sensorial [15]. Ambos valores varían en función del tipo de compuesto de que se trate y del individuo que reciba el estímulo, porque, según el odorante, se estimulan unos u otros receptores y cada ser humano presenta un sistema olfatorio diferente, más o menos desarrollado. De ahí que la importancia de un compuesto aromático en un producto no pueda determinarse simplemente por la concentración en la que aparezca.

Además, estos dos valores dependen en gran medida de la matriz en la que se encuentre el compuesto, ya que será ella quien determine cómo llegará el odorante a nuestra nariz [25]. Se pueden dar interacciones con los lípidos, las proteínas o los carbohidratos, de manera que los odorantes queden más o menos retenidos. En matrices grasas y aceites, por ejemplo, las moléculas volátiles más apolares serán las más solubles y las que se inhalarán con menos facilidad. También hay que tener en cuenta las condiciones del medio (pH, presencia de oxígeno, humedad, etc.), porque pueden modificar las sustancias aromáticas [26]. Y a todo esto hay que añadir las posibles interacciones entre odorantes de la misma matriz: si estos compuestos potencian la capacidad de detectar el olor, se les denomina sinérgicos, mientras que, si interfieren en ella, se les llama antagonistas [1, 2, 7, 15].

En cuanto a la *cualidad de un aroma*, ésta es su identidad sensorial y la definimos con los descriptores sensoriales que asignamos a dicho olor cuando la concentración del odorante que lo origina supera el umbral de reconocimiento. Dependiendo de la

complejidad del odorante serán necesarios uno o más descriptores, los cuales a su vez pueden ir acompañados de distintos matices.

Para algunos compuestos, la cualidad de su olor varía con la concentración, lo que también implica que estos compuestos tengan varios umbrales de reconocimiento. Es el caso del (E)-2-nonenal: justo por encima de su umbral de detección (0,1 µg/L) presenta olor a madera, mientras que por encima de los 8 µg/L, huele a grasa. A una concentración de 30 µg/L se convierte en desagradable y en una disolución acuosa de 1 mg/L presenta un intenso olor a pepino [2].

Por último, el *valor hedónico* o *tonalidad afectiva* hace referencia a la sensación que nos produce el olor que percibimos, si nos resulta agradable o desagradable, por ejemplo. Está relacionado con la interpretación subjetiva que cada individuo hace del olor, el cual es capaz de influir en nuestras emociones y modificar nuestro comportamiento. Además, la memoria olfativa es sumamente superior a la proporcionada por la vista o el oído, y permite recuperar todo el contexto emocional en el que se memorizó un determinado olor [5, 6].

Pero el olfato también debe ser visto como nuestro primer sistema de alarma frente a peligros tan diversos como el fuego, un escape de gas o comida estropeada [3]. Nuestro cuerpo reacciona incluso frente a olores de alimentos que nos han hecho enfermar, haciendo que durante mucho tiempo no tengamos ganas de consumirlos [7].

#### **2.2.4.- Valor de aroma**

El *valor de aroma* u *Odor Activity Value* (OAV) es el cociente entre la concentración de un odorante y su umbral de percepción, y proporciona una primera idea sobre la importancia o contribución de dicho odorante al aroma global del producto en el que se encuentre. Si la concentración del compuesto es igual o superior al umbral de detección, entonces el OAV es igual o mayor que la unidad y el compuesto participará en el aroma, tanto más, cuanto mayor sea el cociente.

Sin embargo, este parámetro no tiene en cuenta los efectos sinérgicos y antagónicos que se pueden dar entre odorantes. Además, asume que la relación entre la concentración de un compuesto y la intensidad con la que se percibe es lineal, cuando en realidad no lo es. De acuerdo con la ley universal para los estímulos fisiológicos formulada por Stevens [15], la variación de la intensidad respecto a la concentración es exponencial:

$$E = k \cdot (S - S_0)^n$$

donde  $E$  es la intensidad de la percepción,  $k$  es una constante de proporcionalidad que depende de cada estímulo,  $S$  es la concentración del estimulante y  $S_0$ , su concentración umbral. El exponente  $n$  establece la tasa de aumento de la intensidad percibida con la concentración, ante la intensidad física del estímulo.

Por tanto, para el caso del aroma habrá una clara dependencia entre la intensidad del olor dada por un compuesto y su concentración, pero que variará en función del tipo de odorante y de la matriz que lo contenga, ya que tanto  $n$  como  $S_0$  dependen de estas variables. Sin embargo, aunque el OAV constituya un parámetro aproximado, sí proporciona de forma rápida una idea acerca de la importancia sensorial de un compuesto, lo que permite evaluar y transformar de manera sencilla los datos obtenidos a partir del análisis cuantitativo en información sensorial [27].

### **2.2.5.- Compuestos aromáticos con carácter impacto (*key odorants*)**

De forma general, el aroma de un producto está constituido por un número elevado de compuestos volátiles muy diversos, cada uno con una mayor o menor contribución al aroma, pero todos ellos necesarios para proporcionar el aroma único y característico de ese producto [15, 28]. Sin embargo, también existen algunos compuestos volátiles que, por sí mismos, son capaces de proporcionar al producto su olor característico.

Son los denominados *compuestos con carácter impacto* o *compuestos clave* (*key odorants*) [2], cuyo olor es el que da la identidad sensorial al propio producto, tal y

como puede observarse en la **Tabla 2.1**, donde aparecen algunos ejemplos de compuestos con carácter impacto, el alimento en el que se encuentran y el descriptor universalmente empleado para describir el olor del odorante.

<b>Alimento</b>	<b>Odorante</b>	<b>Descriptor</b>
Almendras	Benzaldehido	Almendras amargas
Col	Sulfuro de dimetilo	Col
Limón	Neral/geranial	Limón
Pepino	2-(E)-6-(Z)-nonadienal	Pepino
Pimiento verde	3-isobutil-2-metoxipirazina	Pimiento verde
Remolacha	Geosmina	Terroso
Setas	1-octen-3-ona	Champiñón
Vainilla	Vainillina	Vainilla

**Tabla 2.1.** Compuestos aromáticos con carácter impacto

### **2.2.6.- Compuestos aromáticos en los alimentos**

Según distintos estudios, sólo un 5% de los 8000 compuestos volátiles identificados en los alimentos contribuye realmente a su aroma [15]. Sin embargo, el abanico de olores en los alimentos es inmenso, lo que se explicaría por la gran especificidad y selectividad de los receptores de nuestro sistema olfatorio [7].

Estos compuestos, sin apenas valor nutricional, constituyen uno de los primeros contactos que los consumidores tienen con los alimentos, siendo en gran medida responsables de su aceptación o rechazo, razón por la cual se consideran importantes índices de calidad. Sus orígenes son variados, en función del tipo de alimento y del compuesto de que se trate, pero en general se producen a partir de dos tipos de reacciones: las enzimáticas y las no enzimáticas.

Dentro de las reacciones no enzimáticas encontramos la reacción de Maillard y su asociada, la degradación de Strecker de los aminoácidos, así como la pirólisis de las proteínas, la oxidación de los lípidos vía radicales libres y la heterólisis de los carbohidratos, además de distintas interacciones posteriores entre los productos intermedios. A temperatura ambiente, estas reacciones no se dan (como es el caso de la pirólisis de las proteínas), o bien necesitan tiempos de almacenamiento prolongados para producirse, pero se ven favorecidas durante el tratamiento térmico de los alimentos. De hecho, las altas temperaturas utilizadas durante la fritura, la cocción, el asado o el tostado, enriquecen la diversidad aromática, por lo que son acciones habituales en el procesado de alimentos, como es el caso de la caramelización o el ahumado. Gracias a ellas, la superficie del alimento se deshidrata y comienza la pirólisis de los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y demás constituyentes, generándose los distintos odorantes: compuestos carbonílicos, pirazinas, pirroles, piridinas, furanonas, compuestos azufrados, fenoles, etc. [2, 15].

Respecto a las reacciones enzimáticas, forman parte del metabolismo de los animales, las plantas y los microorganismos. Los aromas generados a partir de ellas son productos secundarios de las distintas rutas metabólicas, diferenciándose de los metabolitos primarios (proteínas, lípidos, carbohidratos) en que no poseen ninguna función fisiológica directa. Algunas de las reacciones enzimáticas más importantes se desencadenan tras la rotura de los tejidos, especialmente durante el troceado de frutas y verduras. También hay algunas enzimas implicadas indirectamente en la formación de los aromas, ya que ellas llevan a cabo la primera etapa del proceso, liberando aminoácidos de las proteínas, azúcares de los polisacáridos u orto-quinonas de los compuestos fenólicos, los cuales son posteriormente convertidos en compuestos aromáticos por reacciones no enzimáticas. De este modo se generan aldehídos, ésteres, hidrocarburos, lactonas, terpenos, pirazinas, compuestos azufrados, etc. [2, 15].

Gracias a todas estas reacciones, tanto a las enzimáticas como a las no enzimáticas, algunos alimentos presentan el aroma que los caracteriza [28]. Es el caso

de los frutos secos tostados, cuyo olor es muy característico, a pesar de que son prácticamente inodoros antes de ser procesados térmicamente [29, 30]. Algo parecido le pasa al pan: es necesaria una primera fermentación seguida de un horneado para que su corteza desprenda el típico aroma a pan recién hecho [15]. En cuanto a las carnes y los pescados ahumados, el ahumado constituía inicialmente un método de conservación de los alimentos, pero el proceso aportaba un aroma tan peculiar a los productos que en la actualidad se utiliza más como método aromatizante que como conservador [2].

### **2.2.7.- Olores anómalos (*off-flavours*)**

Dada la estrecha relación que tienen aroma y calidad, y el importante papel que juega el primero en la elección de los distintos productos por parte del consumidor, un aspecto a tener muy en cuenta es la posible aparición de olores extraños o anómalos. Estos defectos u “*off-flavours*” son atributos sensoriales que normalmente no están presentes en el alimento y que no se asocian, por lo tanto, con su aroma típico [15, 28]. Pueden ser sutiles o muy acusados, pero en cualquier caso repercuten negativamente en la calidad del alimento.

Los *off-flavours* pueden originarse de diversas maneras: por utilización de ingredientes inapropiados, por contaminación (a través del aire, del agua, por interacción con los materiales del envasado), por reacciones químicas y microbiológicas que tienen lugar en el propio alimento (oxidaciones, pardeamientos no enzimáticos, reacciones inducidas por la luz, etc.), o por el mismo proceso natural de deterioro del producto [7, 28], no sólo durante el procesado, sino también durante el envasado y el almacenamiento. En general, estas acciones llevan a la pérdida de compuestos impacto, a cambios en la concentración de una o varias sustancias o a la aparición de otros compuestos que pasan a convertirse en *key odorants*, pero cuya presencia no se asocia al alimento en el que aparecen.

## 2.3.- EL ANÁLISIS DEL AROMA

Tradicionalmente, el análisis sensorial ha sido el método empleado para evaluar la calidad de los alimentos, y aún hoy en día se sigue utilizando, ya que gracias a él se obtiene una valiosa información sobre las propiedades sensoriales y, lo que es más importante, sobre la aceptación o el rechazo de esos alimentos por parte del consumidor.

El aroma no es ajeno a estos procedimientos sensoriales de análisis. De hecho, la única manera de conocer la percepción global que se experimenta cuando se huele un producto es mediante este tipo de análisis, a través de las denominadas *catas*. Sin embargo, su utilización conlleva una serie de inconvenientes, como la necesidad de emplear un panel de catadores entrenado, constituido por un número considerable de individuos, así como un elevado coste (tanto de dinero como de tiempo), entre otros factores. De ahí la existencia y el extendido empleo del análisis instrumental.

Dado que los compuestos que constituyen el aroma son moléculas volátiles, de entre las distintas técnicas analíticas que existen, la cromatografía de gases es la más adecuada para analizar la fracción aromática. El desarrollo de detectores específicos y la aparición de la espectrometría de masas han permitido separar e identificar cientos de compuestos implicados en el aroma de los alimentos a lo largo de los últimos años [31]. Sin embargo, esto no es suficiente. Únicamente con una lista de odorantes no se puede saber qué es lo que realmente experimenta la persona que huele un producto.

En la actualidad, el análisis del aroma va encaminado hacia el desarrollo de instrumentos que, tras una calibración inicial en base a los datos proporcionados por un panel sensorial, puedan realizar el análisis como si fueran un catador, pero de manera rápida y objetiva. Se trata de las denominadas "*narices electrónicas*", las cuales, si bien no podrán sustituir totalmente a los paneles de catadores, porque siempre necesitarán de una primera calibración sensorial, sí podrán complementarlos al encargarse de los análisis masivos y rutinarios.

### **2.3.1.- El análisis sensorial**

El análisis sensorial permitió, ya a los primeros humanos, diferenciar entre alimentos buenos o malos, y actualmente lo seguimos empleando cada vez que elegimos un producto, y no otro, basándonos en la percepción de sus propiedades sensoriales (ya sea de forma consciente o inconsciente). Sin embargo, los análisis sensoriales estandarizados, más allá de los realizados por el consumidor a título personal, tienen como objetivo fundamental llevar a cabo estudios válidos y fiables en los que se cuantifique la intensidad y la forma de un estímulo utilizando los sentidos como instrumentos de medida [32]. La información obtenida servirá para, por ejemplo, evaluar la calidad organoléptica de las materias primas, seguir la transformación del producto a lo largo del proceso de elaboración, detectar defectos en el producto terminado, o conocer las preferencias de los consumidores, datos que permitirán tomar importantes decisiones relacionadas con la producción y el marketing. De ahí que sea necesario seguir metodologías y técnicas específicas.

#### **2.3.1.1.- El panel sensorial**

Antes de llevar a cabo un análisis sensorial hay que constituir el panel de catadores, y el primer paso para hacerlo es establecer, en función del tipo de pruebas que se vayan a realizar, si se requiere un jurado de expertos o uno de consumidores. En cualquiera de los dos casos es necesario reclutar, seleccionar y entrenar previamente a los integrantes de dicho panel [32, 33].

Con el reclutamiento, lo que se pretende es reunir un número adecuado de personas potencialmente aptas o que presenten ciertas aptitudes para el análisis de alimentos. En esta primera fase, además de solicitarse información general, es necesario averiguar la disponibilidad de los candidatos y si presentan restricciones alimenticias. Así podrá saberse quiénes tienen interés por este tipo de análisis y/o pueden llevarlos a cabo.



Gracias a la selección, se adquiere una idea del comportamiento general de los individuos, pudiéndose determinar su capacidad para realizar pruebas sensoriales (si detectan diferencias en los alimentos según el aspecto, el olor, la textura,...) y su aptitud descriptiva.

Por último, con el entrenamiento se aprende a describir (construir una terminología) y a evaluar las características sensoriales de un alimento (técnicas de degustación o cata). Así, terminan identificándose y describiéndose las percepciones, determinándose el orden de aparición y el grado de intensidad de cada propiedad, y reconociéndose la persistencia.

Esta última fase es la más larga y laboriosa de todas, ya que el percibir las sensaciones y traducirlas a un lenguaje uniforme y a datos matemáticos también implica un proceso de memorización. Porque, aunque los seres humanos somos capaces de detectar un gran número de sensaciones, hemos de aprender a relacionarlas con aquéllas que son de referencia.

En cualquier caso, tanto si se trata de catadores experimentados como de simples consumidores, se necesita un número elevado de individuos que, además, deben cumplir con una serie de requisitos: disponibilidad, motivación, capacidad de expresión, etc. A esto hay que añadirle que sólo puede realizarse un número limitado de análisis al día, ya que, si hablamos del análisis sensorial del aroma, la sensibilidad olfativa se ve reducida por la exposición prolongada a ciertos olores. Y no hay que olvidar la variabilidad entre individuos y los problemas inherentes a cada catador (además de la inevitable subjetividad): anosmias que impiden detectar ciertos compuestos, variaciones en la sensibilidad perceptiva (por el cansancio, los procesos catarrales, los cambios hormonales,...), etc.

Sin embargo, y a pesar de los inconvenientes que implica, el análisis sensorial sigue siendo la forma más adecuada para evaluar aquellos alimentos que no se consumen por sus propiedades nutritivas, sino por el placer que produce su

degustación. Es la única manera de determinar su calidad, dado que ésta depende en gran medida de la satisfacción personal que proporcionen al consumidor.

### **2.3.1.2.- Las pruebas sensoriales**

En el análisis sensorial se distinguen básicamente tres tipos de pruebas: las pruebas de preferencia y aceptación, las pruebas de discriminación o diferencia y las pruebas descriptivas [33, 34].

Las *pruebas de preferencia y aceptación* proporcionan una guía a la hora de identificar los factores que influyen en las preferencias de los consumidores, ya que no se realizan con paneles de expertos, sino con grupos de los propios consumidores. Se apoyan en el grado de preferencia o en una medida que permita determinar la preferencia relativa, y están muy influenciados por la atracción personal que cada participante siente hacia el producto.

Las *pruebas de discriminación o diferencia* permiten distinguir adecuadamente las muestras entre sí. En ellas, la persona que lleva a cabo el análisis no tiene en cuenta sus gustos personales. Se emplean cuando las diferencias entre productos son tan pequeñas que no pueden ser descritas (es el caso de los tests triangulares, donde hay que señalar cuál de las tres muestras proporcionadas es distinta a las otras dos), o bien cuando quieren determinarse los umbrales de percepción sensorial.

En cuanto a las *pruebas descriptivas*, se utilizan para determinar la naturaleza y la intensidad de las diferencias y consisten en examinar los atributos de los alimentos (olor, textura, sabor, etc.) para obtener una descripción detallada de los mismos. Las realizan catadores entrenados, los cuales, además, deben utilizar un vocabulario específico y común establecido de antemano. Gracias a ellas se puede diferenciar entre muestras, definir el tipo de producto y establecer su aceptabilidad en función de la calidad de sus atributos (en nuestro caso, el aroma).

La elección de una u otra prueba se realizará teniendo en cuenta el objetivo que se persiga con la aplicación del análisis sensorial a un producto determinado.

### **2.3.2.- El análisis instrumental**

Como ya se ha visto previamente, el aroma de los alimentos está constituido por numerosos y muy heterogéneos compuestos volátiles, presentes en concentraciones de muy distinta magnitud (desde ppm hasta ppt), aunque, por lo general, bajas respecto a las de otros compuestos mayoritarios [15]. Sin embargo, dada la gran sensibilidad de nuestro sistema olfatorio, muchos de estos compuestos volátiles superan el umbral de percepción aún estando a estas bajas concentraciones [35]. Además, no hay que olvidar las posibles interacciones que pueden darse con otros componentes de los alimentos que afectan a la retención de los volátiles y a la intensidad y calidad del aroma.

Por todo ello, el análisis instrumental del aroma de los alimentos debe llevarse a cabo únicamente si previamente se han tratado las muestras y se han aislado los compuestos aromáticos, de manera que se hayan eliminado las interferencias que puedan producir otros tipos de compuestos. En este proceso hay que tener en cuenta que el rango de polaridad, volatilidad y concentración que presentan los odorantes de los alimentos es muy amplio y que en muchos casos va acompañado por problemas de inestabilidad. Por este motivo, la etapa de preparación de la muestra suele ser la más crítica de todo el proceso analítico, resultando difícil escoger un método adecuado para el análisis de todos los compuestos volátiles de manera simultánea [36].

#### **2.3.2.1.- Las técnicas de pretratamiento**

Son muchas las técnicas empleadas en la preparación de las muestras para el análisis del aroma. La elección de una u otra depende, en gran medida, de los compuestos que se quieran analizar. Todas presentan ventajas e inconvenientes, y

debe ser el analista quien sopesa cada uno de los factores antes de decantarse por una técnica en concreto [36].

A continuación se presentan las técnicas de preparación de muestra más comunes y ampliamente utilizadas en el análisis del aroma de alimentos, aunque en modo alguno pretende ser una revisión exhaustiva. Solamente la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción con disolventes se describirán con más detalle en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral, al haber sido las técnicas implicadas en su desarrollo experimental.

### **Técnicas de destilación**

Estos métodos de separación se basan en la distinta volatilidad de los componentes de una muestra. En el caso del aroma, los compuestos aromáticos presentan una volatilidad mucho mayor que el resto de los componentes de los alimentos. Por este motivo, es posible separar los primeros del resto de la matriz de forma rápida mediante su vaporización y posterior condensación, lo cual se consigue con una instrumentación sencilla [36, 37]. En el caso de muestras acuosas, hay que tener en cuenta que el agua puede constituir una interferencia importante, ya que, al tener un punto de ebullición relativamente bajo, también se destilará junto con los volátiles. Si la cantidad de agua que se extrae es excesiva, entonces será necesario eliminarla por adición de sales anhidras, por congelación-concentración o bien mediante una extracción con disolventes [38].

La más sencilla de estas técnicas es la destilación directa. Sin embargo, no es aconsejable aplicarla más que sobre alimentos con un alto contenido en grasas e, incluso en estos casos, el hecho de someter a las muestras a temperaturas elevadas puede provocar cambios en la composición del aroma, por lo que generalmente se utiliza la destilación con arrastre de vapor o la destilación a vacío. En esta última no se sobrepasan los 35 °C, con lo que no se produce descomposición de la muestra ni aparecen artefactos por degradación térmica.

No obstante, con las técnicas de destilación no suele conseguirse una concentración adecuada de los compuestos volátiles, por lo que, previamente a su inyección en el cromatógrafo de gases, es necesario concentrarlos. En este sentido, la destilación-extracción simultánea consigue solventar este problema. Mientras la muestra dispersada en agua se calienta hasta ebullición, el vapor que se genera y que contiene los volátiles es dirigido hacia una parte del aparato empleado donde condensa junto a los vapores de un disolvente extractante. De esta manera, gracias a la condensación conjunta, se recuperan los compuestos aromáticos por volatilidad y por solubilidad en el disolvente [38], lográndose en un solo paso la extracción y la concentración de los odorantes, y, además, empleando un pequeño volumen de disolvente orgánico. El inconveniente es que se requiere una instrumentación más compleja y tiempos largos [39].

### **Extracción con disolventes**

Ésta es una de las técnicas más utilizadas para extraer los compuestos volátiles de los alimentos, distinguiéndose entre la extracción líquido-líquido (LLE), cuando la matriz es líquida, y la extracción directa con disolventes (DSE), cuando la matriz es sólida. En ambos casos se emplean disolventes orgánicos (diclorometano, éter dietílico, hidrocarburos, etc.) y la extracción se lleva a cabo durante períodos de tiempo largos (entre 8 y 12 horas). Finalmente, es necesaria una concentración del extracto mediante evaporación del disolvente [36-38].

Aunque estas técnicas dan buenos resultados y presentan ventajas, como su gran sensibilidad y sencillez, también cuentan con numerosos inconvenientes. Entre ellos, que de forma general utilizan grandes volúmenes de disolventes orgánicos perjudiciales para el medio ambiente, que necesitan tiempos de análisis muy largos con una gran manipulación de las muestras o su baja selectividad [36, 39], por lo que empiezan a ser sustituidas por otras técnicas más rápidas, eficaces y limpias.

### **Técnicas de espacio de cabeza**

Las técnicas de espacio de cabeza (o *headspace*) consisten en extraer los compuestos volátiles de la fase gaseosa que está en equilibrio con la matriz, de forma que se obtiene un extracto lo más parecido posible a la fracción volátil que inhalamos y que llega hasta nuestro epitelio olfatorio cuando olemos un producto.

Se dividen en dos grandes grupos en función del sistema de muestreo: las técnicas estáticas y las técnicas dinámicas. En general, ambas se caracterizan por una manipulación mínima de las muestras y por no emplear disolventes orgánicos, lo que permite obtener extractos mucho más limpios, sin impurezas ni contaminantes. Esto evita la interferencia cromatográfica del pico del disolvente, que muchas veces impide la determinación de algunos volátiles, como ocurre cuando se llevan a cabo extracciones con disolventes. Además, estas técnicas no dañan ni destruyen las muestras, ya que se limitan a extraer las fracciones volátiles, y precisamente por eso tampoco originan artefactos que puedan interferir en el posterior análisis del aroma. De igual modo, estos procesos pueden automatizarse, lo que proporciona una mayor repetitividad [36, 39, 40].

Respecto a la técnica de espacio de cabeza estático, simplemente consiste en introducir el producto a analizar en un recipiente cerrado (que puede ser un vial) y dejar que las moléculas volátiles de la matriz alcancen el equilibrio entre la fase sólida o líquida que las contiene, y la fase gaseosa. Una vez alcanzado dicho equilibrio, el espacio de cabeza es introducido directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, lo que hace que la técnica sea sumamente sencilla.

Sin embargo, también hay que tener en cuenta los inconvenientes que presenta. Uno de ellos es la tendencia a discriminar aquellos compuestos menos volátiles, lo que implica distintas recuperaciones de los analitos en función de su volatilidad, factor que habrá que tener en cuenta si se desea hacer análisis cuantitativos. Además, aunque se puede aumentar su rendimiento modificando la fuerza iónica de la muestra, incrementando la temperatura o aplicando agitación, esta técnica no

permite concentrar los volátiles, lo que provoca una baja sensibilidad del método, insuficiente para los compuestos que se encuentren en menor concentración. Así pues, sus límites de detección (del orden de ppm) son peores que los que se logran con otras técnicas.

Pero la técnica del espacio de cabeza estático ha demostrado ser adecuada para separar los compuestos volátiles mayoritarios del aroma, lo que resulta de gran interés en algunos estudios en los que la información que contiene esta fase gaseosa es suficiente para sus propósitos, como ocurre, por ejemplo, en la técnica de la nariz electrónica [41].

En la técnica de espacio de cabeza dinámico, y al contrario de lo que ocurre en la estática, no se deja alcanzar el equilibrio de los volátiles entre la matriz y la fase gaseosa, sino que el equilibrio se ve desplazado constantemente hacia la fase gaseosa. Los analitos son arrastrados de forma continua por un gas inerte hacia una trampa, en la que quedan retenidos. Es por ello que esta técnica también se conoce con el nombre de “purga y trampa” (P & T). De esta trampa, que puede ser criogénica o adsorbente, los analitos son transferidos al cromatógrafo de gases mediante desorción, generalmente térmica. Así se consigue incrementar el número, y también la cantidad, de volátiles que se extraen de la matriz con respecto al *headspace* estático, lo que permite rebajar los límites de detección al orden de ppt.

Pero al igual que en el resto de técnicas de preparación de muestra, para el *headspace* dinámico también existen inconvenientes, la mayoría relacionados con las trampas en las que se retienen los volátiles. En el caso de las trampas criogénicas, éstas son especialmente sensibles al agua, por lo que es necesario eliminar el vapor de agua antes de que llegue a la trampa. También presentan un coste relativamente alto y requieren tiempos de análisis ligeramente más largos, ya que necesitan volver a enfriarse antes del siguiente análisis. Por su parte, las trampas con materiales adsorbentes, como polímeros porosos (Tenax, Porapak, Chromosorb) o carbón activo, son más selectivas, pero hay que tener en cuenta su volumen de ruptura para evitar

pérdidas. Además, pueden presentar un efecto memoria. Es decir, algunos compuestos no se desorben totalmente, sino que quedan fuertemente retenidos en la trampa, apareciendo en análisis posteriores [39, 40].

### **Técnicas de extracción en fase sólida**

En los últimos años, las técnicas de extracción en fase sólida han derivado en métodos ampliamente utilizados para el análisis de los compuestos aromáticos de los alimentos, gracias a su rapidez y sensibilidad y a que, o bien emplean cantidades de disolventes mucho menores que las extracciones con disolventes, o bien se llevan a cabo, directamente, sin necesidad de ellos. De entre ellas cabe distinguir la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y la *stir bar sorptive extraction* (SBSE) [38, 42].

La SPE fue introducida a finales de los años 70, e implica la utilización de un sólido adsorbente, en forma de cartuchos o discos, que actúa como fase estacionaria a través de la cual, tras un breve paso de acondicionamiento, se hace pasar la muestra. En función de la naturaleza de la fase estacionaria y del tipo de muestra de que se trate, gracias a la SPE se puede llevar a cabo un *clean-up* de dicha muestra (si los compuestos que quedan retenidos en el sólido son interferencias) o un fraccionamiento de los analitos de interés (cuando los compuestos que quedan retenidos en la fase estacionaria son los que quieren extraerse de la matriz). En este segundo caso es necesario un posterior proceso de elución mediante disolventes orgánicos, con el objetivo de recuperar esos analitos, y que, normalmente, se realiza aplicando vacío para aumentar la velocidad del procedimiento [42, 43]. De forma general, los adsorbentes que se emplean no son selectivos, ya que deben cubrir un amplio rango de polaridades, y la mayoría son materiales con sílice en su estructura o copolímeros de estireno-divinilbenzeno. El rendimiento de esta técnica de extracción depende del tipo de adsorbente y de los disolventes utilizados, y, aunque válida para determinar concentraciones a niveles traza, la SPE está limitada a compuestos de volatilidad baja o moderada. Además, las muestras han de atravesar la fase



estacionaria, por lo que tienen que ser líquidas o gaseosas y, si son sólidas, estar en disolución.

Por su parte, la microextracción en fase sólida es una técnica aparecida a principios de los años 90 que permite la extracción y concentración simultáneas de los compuestos [44]. En este caso, la fase estacionaria donde los analitos quedan retenidos recubre una fibra de sílice fundida de pequeñas dimensiones, la cual puede exponerse al espacio de cabeza de la muestra a analizar o a la propia muestra. Tras la extracción, la fibra se inserta en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, y los compuestos se desorben térmicamente. Las principales ventajas que presenta la SPME son su simplicidad, la manipulación prácticamente nula de la muestra, el que no requiera disolventes o elevadas temperaturas durante la extracción y su gran selectividad, ya que existe una amplia variedad de fases estacionarias comercializadas, y en función de ésta y del grosor de la misma, la fibra tendrá una mayor o menor afinidad por un determinado tipo de compuestos [39, 45].

Por último, dentro de las técnicas de extracción en fase sólida, también encontramos la *stir bar sorptive extraction*, técnica derivada de la SPME y surgida en 1999 [46]. Aquí, la que está recubierta por una fina capa de fase estacionaria es una pequeña barra imantada, que puede colocarse sobre el *headspace* de la muestra o dentro de la propia muestra (si ésta es líquida). En el primer caso, la técnica se denomina *headspace sorptive extraction* (HSSE). En el segundo, tras la extracción de los volátiles, la barra debe lavarse con agua destilada para eliminar los posibles compuestos interferentes, como azúcares o proteínas, y se seca empleando un pañuelo de papel. A continuación, el imán es sometido a una desorción térmica y los analitos pasan directamente a la columna cromatográfica [42, 47]. La ventaja que presenta la SBSE frente a la SPME es su mayor sensibilidad y la posibilidad de determinar volátiles que aparezcan en concentraciones traza, gracias a la mayor cantidad de fase estacionaria empleada para recubrir la barra y, por tanto, a su mayor capacidad de extracción [39, 46]. Entre sus inconvenientes, que la disponibilidad actual de fases estacionarias se reduce a recubrimientos de polidimetilsiloxano

(PDMS), aunque comienzan a hacerse pruebas con PDMS y carbón con buenos resultados para la extracción de compuestos muy volátiles [42].

### Otras técnicas

Una alternativa a la extracción líquido-líquido es la microextracción líquido-líquido (LLME), también llamada *single-drop microextraction* (SDME). Como la SPME, ésta no es una técnica exhaustiva, y únicamente una parte de los analitos se extrae y preconcentra para el análisis. Consiste en depositar una gota de disolvente con una microjeringa en el vial donde se encuentre la muestra. La mezcla se agita, o incluso se calienta, y se deja que la extracción alcance el equilibrio antes de retirar con la jeringa el extractante, el cual se inyecta posteriormente en el cromatógrafo [42, 43]. En ella, como en la LLE, se emplea un disolvente orgánico inmisible con la muestra, pero en este caso, el volumen es mucho menor, del orden de  $\mu\text{L}$ , con lo que se reduce la problemática medioambiental.

También se ha aplicado la técnica de la sonicación para extraer compuestos aromáticos de distintos alimentos y bebidas. Esta técnica de extracción asistida por ultrasonidos (USAE) aplica vibraciones acústicas con frecuencias por encima de los 20 kHz, lo que permite un contacto íntimo entre la muestra y el disolvente [42, 48]. El problema es que, aunque rápida, la eficacia de la extracción no es tan alta como la que se logra con otros métodos y, si se incrementa el tiempo de sonicación, esto implica un aumento de la temperatura, con las desventajas que conlleva.

Otra técnica, ya empleada desde hace décadas a nivel industrial para, por ejemplo, descafeinar el café y el té, procesar productos de origen vegetal y animal, o extraer ingredientes activos de distintas matrices, pero cuya aplicación como método de extracción de compuestos aromáticos es relativamente nueva, es la extracción con fluidos supercríticos. En ella se emplea dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) gaseoso al que se le aplican una presión y temperatura suficientes para que alcance el estado supercrítico, cosa que logra a  $30'9\text{ }^\circ\text{C}$  y  $73'8\text{ bar}$ . En este punto, el  $\text{CO}_2$  adquiere propiedades de disolvente [36, 42, 47], por lo que no es necesario utilizar disolventes orgánicos.

Además, y gracias a las especiales propiedades adquiridas, el dióxido de carbono consigue extraer compuestos no muy volátiles o fuertemente unidos a la matriz, de forma respetuosa con el medio ambiente y relativamente barata. En su contra, la dificultad para lograr un equilibrio entre presión, temperatura y flujo para cada tipo de muestra (lo que se traduce en largos tiempos de análisis), y el carácter apolar del dióxido de carbono, que no permite extraer de forma eficiente analitos polares [36, 39, 42].

### **2.3.2.2.- La cromatografía de gases**

Aparecida en 1952, la cromatografía de gases (GC) es la técnica más adecuada para analizar la fracción volátil de los alimentos, entre otras cosas por los avances que se han producido tanto en las columnas cromatográficas como en los sistemas de detección durante el más de medio siglo transcurrido desde entonces [31].

Inicialmente, las columnas que se empleaban estaban rellenas de un material sólido o de soportes sólidos recubiertos con líquidos que actuaban como fase estacionaria. Sin embargo, su capacidad de separación era limitada, y no fue hasta el desarrollo de las columnas capilares cuando se produjo el primer avance importante en la investigación del aroma de los alimentos. Estas columnas, con diámetros internos sumamente pequeños (0'25, 0'32 ó 0'53 mm) y una fina capa de fase estacionaria unida a la pared interna de las propias columnas, presentan una gran capacidad para separar mezclas complejas de compuestos volátiles [31, 43].

En cuanto a los sistemas de detección, hay que distinguir entre los detectores universales, que proporcionan señal cuando les llega cualquier tipo de molécula, y los detectores específicos, que únicamente proporcionan señal si les llegan moléculas de unas determinadas características [31, 43].

Entre los detectores universales, el más utilizado es el detector de ionización de llama (FID), porque da respuesta a casi todos los compuestos orgánicos. Además,

presenta una buena sensibilidad y una respuesta lineal en un amplio rango de concentraciones, es estable y requiere poco mantenimiento.

Otro sistema de detección muy utilizado en la actualidad es la espectrometría de masas (MS), desarrollada en los años 70 del siglo pasado. Gracias a la fragmentación de las moléculas que proporciona y a la existencia de un amplio *software* con librerías espectrales, se pueden identificar los distintos analitos separados por la columna, lo que ha conducido a un gran avance en la investigación del análisis de los volátiles de los alimentos. Además, también permite la detección en modo SIM (*Selective Ion Monitoring*), muy útil en el caso de los compuestos que aparecen a nivel traza, ya que aumenta la sensibilidad de la técnica al seleccionarse previamente las masas de los iones más abundantes del espectro de los analitos de interés.

Respecto a los detectores específicos, sirven para analizar determinados compuestos o determinadas familias de compuestos. Entre ellos destaca el detector de captura electrónica (ECD), muy sensible a los compuestos halogenados, y el detector de nitrógeno-fósforo (NPD), que permite analizar compuestos nitrogenados o con fósforo en su estructura, y que también presenta una elevada sensibilidad. En cuanto a los compuestos azufrados, los dos detectores más utilizados son el fotométrico de llama (FPD) y el de quimioluminiscencia (SCD), ya que son muy sensibles a los átomos de azufre.

De este modo se ha obtenido un amplio conocimiento de la composición de la fracción volátil de los alimentos. Sin embargo, a la hora de intentar relacionar los resultados cromatográficos obtenidos con las percepciones sensoriales que se tienen al oler un determinado producto, los diferentes datos no terminan de encajar. Y es que existen muchos compuestos volátiles en cada alimento, pero no todos presentan olor. Es más: de todos los compuestos aromáticos, sólo unos pocos, aquéllos cuya concentración está por encima de su umbral de percepción sensorial, realmente contribuyen al aroma.

Por este motivo, y con el objetivo de identificar a los odorantes entre la totalidad de la fracción volátil, se desarrolló en 1964 la cromatografía de gases con detección olfatométrica o GCO [49], en la que la nariz humana es utilizada como detector cromatográfico en paralelo con otro detector convencional (generalmente un FID o un MSD). De este modo, los compuestos que eluyen separados de la columna son percibidos por el analista, que es capaz de describir el olor y cuantificar la intensidad aromática, a la vez que el detector convencional proporciona una señal cromatográfica.

En el siguiente capítulo de esta tesis doctoral se describen las distintas metodologías que permiten obtener información cuantitativa de las características aromáticas de los compuestos, así como una discusión más amplia de la GCO y de su aplicación al análisis del aroma de los alimentos.

### **2.3.2.3.- La nariz electrónica**

En la actualidad, la industria alimentaria demanda métodos rápidos, sencillos y fiables que permitan evaluar los compuestos volátiles para la identificación, la autenticación y el control de procesos de sus productos [50]. Hasta ahora, paneles sensoriales constituidos por expertos entrenados han sido quienes han llevado a cabo estas tareas, ayudados por la cromatografía de gases-olfatometría. Sin embargo, es difícil correlacionar las informaciones y además, como ya se vio anteriormente, el análisis sensorial conlleva una serie de inconvenientes imposibles de solventar. Por este motivo, los esfuerzos realizados en el análisis del aroma de los alimentos en los últimos años han ido dirigidos hacia la creación de un instrumento capaz de funcionar como si fuera una nariz humana, con el objetivo de emular a un panel de catadores, y que se ha dado en llamar "*nariz electrónica*" [51].

Una nariz electrónica realiza un análisis global del aroma aportando información básicamente cualitativa: diferencias y similitudes entre muestras, presencia de defectos aromáticos o de notas características, etc., de manera similar a como lo hace

un panel sensorial. Sin embargo, y a diferencia de las técnicas cromatográficas en general, la nariz electrónica no proporciona información detallada sobre la composición química del aroma [39].

Consta de tres partes básicas bien diferenciadas: el sistema de muestreo, el de detección y el sistema de tratamiento de datos. Generalmente, la toma de muestra se realiza mediante técnicas de espacio de cabeza como las que se han descrito previamente. En cuanto al sistema de detección, es la parte principal del instrumento, y en base a él se puede realizar una división de los diferentes tipos de narices electrónicas que existen en el mercado: las que utilizan sensores de gases y las que emplean la espectrometría de masas [52, 53]. Los sensores de gases modifican alguna de sus propiedades cuando los compuestos del aroma interaccionan con su superficie, mientras que la espectrometría de masas actúa como un multisensor con tantos sensores como iones formados en el sistema MS. En ambos casos, la señal que se obtiene es la huella digital del aroma del producto analizado. La última parte de la nariz electrónica es el sistema de tratamiento de datos, que permite tratar con distintas herramientas quimiométricas toda la información obtenida a partir del sistema de detección.

Los buenos resultados obtenidos en distintos estudios en los que se ha utilizado la nariz electrónica, hacen de esta técnica una buena herramienta que puede ayudar en el control de calidad alimentario. Eso sí: siempre y cuando el método de referencia sea el adecuado y, además, se posean suficientes muestras representativas de la variable que se quiera medir para poder llevar a cabo la calibración del equipo de manera fiable [54-56].

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ohloff, G. *Scent and fragrances: the fascination of odors and their chemical perspectives*. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
- [2] Fisher, C., Scott, T. R. *Flavores de los alimentos. Biología y química*. Zaragoza: Acribia, S. A.; 1997.
- [3] Hawkes, C. H., Doty, R. L. *The neurology of olfaction*. 1<sup>st</sup> edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
- [4] Philpott, C. M., Bennett, A., Murty, G. E. A brief history of olfaction and olfactometry. *J. Laryngol. Otol.* 2008; 122: 657-662.
- [5] Boyd, J. *Perfume y sensibilidad*. Llinars del Vallès: Edición Perfumerías; 2009.
- [6] German, J. B., Yeritzian, C., Tolstoguzov, V. B. Olfaction, where nutrition, memory and immunity intersect. En: Berger, R. G., editor. *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin: Springer; 2007, p. 25-41.
- [7] Holley, A. *El cerebro goloso*. 1<sup>a</sup> edición. Barcelona: Rubes Editorial, S. L.; 2006.
- [8] Moran, D. T., Rowley, J. C. III, Jafek, B. W., Lovell, M. A. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J. Neurocytology* 1982; 11: 721-746.
- [9] Holley, A. Processing information about flavour. En: Voilley, A., Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006, p. 36-61.
- [10] Hatt, H. Molecular and cellular basis of human olfaction. En: Kraft, P., Swift, K. A. D., editors. *Perspectives in flavor and fragrance research*. Zürich: VHCA, Wiley-VCH; 2005, p. 1-13.
- [11] Buck, L., Axel, R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991; 65: 175-187.
- [12] Lindemann, B. Receptors and transduction in taste. *Nature* 2001; 413: 219-225.
- [13] Bufe, B., Meyerhof, W. The human perception of taste compounds. En: Voilley, A., Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006, p. 3-35.
- [14] Hänig, D. P. Zur Psychophysik des Geschmackssinnes. *Phil. Stud.* 1901; 17: 576-623.
- [15] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food Chemistry*. 3<sup>rd</sup> revised edition. Berlin: Springer; 2004.
- [16] Gilbert, A. *La sabiduría de la nariz. La ciencia del olfato aplicada a la vida cotidiana*. 1<sup>a</sup> edición. Barcelona: Ediciones B, S. A.; 2009.

- [17] Zwaardemaker, H. *L'Odorat*. París: Octave Doin; 1925.
- [18] Rosch, E. Principles of categorization. En: Rosch, E., Lloyd, B. B., editors. *Cognition and categorization*. Hillsdale: L. Erlbaum; 1978.
- [19] Meilgaard, M. C. Flavor chemistry of beer. *Mast. Brew. Association Am. Technical Q.* 1975; 12: 107-117.
- [20] Noble, A. C., Arnold, R. A., Masuda, B. M., Pecore, S. D., Schmidt, J. O., Stern, P. M. Progress towards a standardized system of wine aroma terminology. *Am. J. Enol. Vitic.* 1984; 35: 107-109.
- [21] Noble, A. C., Arnold, R. A., Masuda, B. M., Pecore, S. D., Schmidt, J. O., Stern, P. M. Modification of a standardized system of wine aroma terminology. *Am. J. Enol. Vitic.* 1987; 38: 143-146.
- [22] Jackson, J. F. Molecular biology of taste and aroma receptors: implications for taste and aroma of plant products. En: Jackson, J. F., Linskens, H. F., editors. *Analysis of taste and aroma*. Berlin: Springer; 2002, p. 1-6.
- [23] Leffingwell, J. C. *Chirality & Odour Perception* [internet]. Leffingwell & Associates; 2002 [actualizada 06-04-2010; acceso 30-09-2010]. Disponible en:  
<http://www.leffingwell.com/chirality/chirality.htm>
- [24] Sell, C. S. Scent through the looking glass. En: Kraft, P., Swift, K. A. D., editors. *Perspectives in flavor and fragrance research*. Zürich: VHCA, Wiley-VCH; 2005, p. 67-88.
- [25] Voilley, A., Souchon, I. Flavour retention and release from the food matrix: an overview. En: Voilley, A., Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006, p. 117-132.
- [26] Salles, C. Odour-taste interactions in flavor perception. En: Voilley, A., Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006, p. 345-368.
- [27] Cacho, J. F. *Los compuestos aromáticos y su significación sensorial*. Jornada tècnica: els compostos aromàtics del vi. Vilafranca del Penedès: Institut Català de la Vinya i el Vi, Universitat de Barcelona; 1999, p. 1-4.
- [28] McGorin, R. J. Character impact compounds: flavors and off-flavors in foods. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002, p. 375-413.
- [29] Chetschik, I., Granvogl, M., Schieberle, P. Comparison of the key aroma compounds in organically grown, raw West-African peanuts (*Arachis hypogaea*) and in ground, pan-roasted meal produced thereof. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 10237-10243.



- [30] Burdack-Freitag, A., Schieberle, P. Changes in the key odorants of Italian hazelnuts (*Coryllus avellana* L. var. Tonda Romana) induced by roasting. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 6351-6359.
- [31] Maga, J. A. Analysis of aroma volatiles. En: Gordon, M. H., editor. *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*. Chichester: Ellis Horwood Limited; 1990, p. 86-110.
- [32] Meilgaard, M., Civille, G. V., Carr, B. T. *Sensory evaluation techniques*. 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton: CRC Press, Inc.; 1991.
- [33] Fortin, J., Desplancke, C. *Guía de selección y entrenamiento de un panel de catadores*. Zaragoza: Acibia, S. A.; 2001.
- [34] Noble, A. C., Lesschaeve, I. Sensory analysis of food flavor. En: Voilley, A., Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006, p. 62-80.
- [35] Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. Garching: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München; 1998.
- [36] Da Costa, N. C., Eri, S. Identification of aroma chemicals. En: Rowe, D. J., editor. *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005, p. 12-34.
- [37] Parliment, T. Solvent extraction and distillation techniques. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002, p. 1-23.
- [38] Reineccius, G. A. Flavour-isolation techniques. En: Berger, R. G., editor. *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin: Springer; 2007, p. 409-426.
- [39] Plutowska, B., Wardencki, W. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chem.* 2007; 101: 845-872.
- [40] Wampler, T. P. Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002, p. 25-54.
- [41] Vera, L., Martí, M. P., Boqué, R., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. Control de calidad de bebidas alcohólicas mediante nariz electrónica. *Cerveza y Malta*. 2008; 180: 25-35.
- [42] de Koning, S., Janssen, H.-G., Brinkman, U. A. Th. Modern methods of sample preparation for GC analysis. *Chromatographia* 2009; 69: S33-S78.

- [43] Miller, J. M. *Chromatography. Concepts and contrasts*. 2<sup>nd</sup> edition. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
- [44] Arthur, C. L., Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 1990; 62: 2145-2148.
- [45] Wardencki, W., Michulec, M., Curylo, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2004; 39: 703-717.
- [46] Baltussen, E., Sandra, P., David, F., Cramers, C. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcol. Sep.* 1999; 11: 737.
- [47] Werkhoff, P., Brennecke, S., Bretschneider, W., Bertram, H.-J. Modern methods for isolating and quantifying volatile flavor and fragrance compounds. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002, p. 139-204.
- [48] Kou, D., Mitra, S. Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices. En: Mitra, S., editor. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2003, p. 139-182.
- [49] Fuller, G. H., Steltenkamp, R., Tisserand, G. A. The gas chromatography with human sensor: perfumer model. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 1964; 116: 711-724.
- [50] López-Feria, S., Cárdenas, S., Valcárcel, M. Simplifying chromatographic analysis of the volatile fraction of foods. *Trends Anal. Chem.* 2008; 27: 794-803.
- [51] Kollmannsberger, H., Nitz, S., Blank, I. Advanced instrumental analysis and electronic noses. En: Berger, R. G., editor. *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin: Springer; 2007, p. 313-361.
- [52] Röck, F., Barsan, N., Weimar, U. Electronic nose: current status and future trends. *Chem. Rev.* 2008; 108: 705-725.
- [53] Wilson, A. D., Baietto, M. Applications and advances in electronic-nose technologies. *Sensors* 2009; 9: 5099-5148.
- [54] Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J. Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *J. Chromatogr. A* 2004; 1057: 211-217.
- [55] Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J., Boqué, R. Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages. *Trends Anal. Chem.* 2005; 24: 57-66.

- [56] Vera, L., Aceña, L., Boqué, R., Guasch, J., Mestres, M., Busto, O. Characterization and classification of the aroma of beer samples by means of an MS e-nose and chemometric tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; doi: 10.1007/s00216-010-4343-y.

## CAPÍTULO 3

### La cromatografía de gases-olfatometría (GCO)



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

### 3.1.- EL ANÁLISIS DEL AROMA MEDIANTE GCO

La evaluación sensorial de los alimentos es tan antigua como los seres humanos, ya que persigue, en última instancia, preservar nuestro organismo. Gracias a ella y a la interconexión que existe entre los sentidos que la llevan a cabo (fundamentalmente, el olfato y el gusto), nuestro sistema digestivo y los centros neuronales que regulan los recuerdos y las emociones, los hombres somos capaces de identificar aquellos alimentos que están ligados a la nutrición, así como de rechazar los productos que no se encuentran en condiciones óptimas y que podrían tener un efecto negativo sobre nuestra salud.

Pero no fue hasta el siglo XIX, con el nacimiento de la química del *flavor*, cuando pudieron identificarse los responsables reales de que un alimento “guste” o “no guste”, de que sea “aceptado” o “rechazado”: los *flavores*. Entre ellos encontramos compuestos volátiles odorantes (responsables del aroma) y sustancias con sabor (responsables del gusto) [1].

En la actualidad, y gracias a la investigación realizada en este campo y a los avances logrados durante los últimos cincuenta años en la química analítica instrumental, el número de sabores que han llegado a determinarse asciende a más de 7000 [2]. Cada uno de estos compuestos puede encontrarse en alimentos de muy distinta naturaleza, del mismo modo que cada producto alimentario contiene cientos de sabores. Sin embargo, sólo unos pocos de estos compuestos realmente contribuyen de forma significativa al aroma y al sabor, ya que esto depende de la concentración en la que aparezcan en el alimento, de la naturaleza de éste, y de sus umbrales de detección [3].

Respecto a la fracción aromática de un determinado producto, son muchos los odorantes responsables de la misma, lo que la convierte en una mezcla compleja de compuestos volátiles de diferente naturaleza química presentes en concentraciones muy variadas. Pero los humanos no somos capaces de distinguir cada una de las

individualidades que conforman el aroma, sino que percibimos un único estímulo global [4]. Por este motivo, si se busca estudiar los distintos responsables del olor que presenta un alimento, es necesario llevar a cabo un análisis cromatográfico que permita la separación de los compuestos. Pero, en la mayoría de los casos, el perfil cromatográfico obtenido mediante un detector convencional (un FID o un MSD) no coincide con el perfil aromático del producto [5]. Y es que existen numerosos compuestos volátiles que no presentan olor y que, por tanto, no participan en el aroma, pero que, si se hallan en concentraciones elevadas, proporcionan picos cromatográficos importantes. Por el contrario, hay odorantes de los que no se consigue señal instrumental porque se encuentran en concentraciones inferiores al límite de detección del detector. Sin embargo, sus umbrales de percepción son tan sumamente bajos que contribuyen al aroma en gran medida. Así pues, para distinguir entre la totalidad de la fracción volátil de un alimento aquellos compuestos que presentan olor y que, por tanto, pueden participar de su aroma, es necesario acoplar a la cromatografía de gases la detección olfatométrica (GCO).

### 3.2.- LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA

Poco tiempo después de inventarse la cromatografía de gases en 1952 [6], los perfumistas y los investigadores de la industria del flavor comenzaron a oler (*"sniff"* en inglés) el gas que efluía del cromatógrafo. En 1964, Fuller, Steltenkamp y Tisserand publicaron por primera vez la descripción del cromatógrafo de gases modificado que permitía a la nariz humana actuar como detector cromatográfico [7]. De esta manera se iniciaba una nueva etapa, que constituía toda una revolución en el análisis del aroma: poder asignar descriptores olfativos a los picos cromatográficos y, más aún, detectar con la nariz olores originados por compuestos que los detectores instrumentales no conseguían registrar. Y, aunque durante los últimos años la sensibilidad de los detectores químicos se ha incrementado enormemente,

lográndose rebajar en gran medida los límites de detección, la nariz humana continúa siendo mucho más sensible a algunas sustancias que cualquier otro detector.

En general, la cromatografía de gases-olfatometría, o GCO, consiste en evaluar con la nariz humana las cualidades aromáticas de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica, a la vez que el detector instrumental instalado proporciona un cromatograma. De esta manera se pueden asignar olores a los picos y/o determinarse a qué tiempos de retención se detectan olores. Así, tal y como puede verse en la **Figura 3.1**, la detección olfatométrica y la instrumental son simultáneas, lo que permite relacionar la información sensorial con la información química.

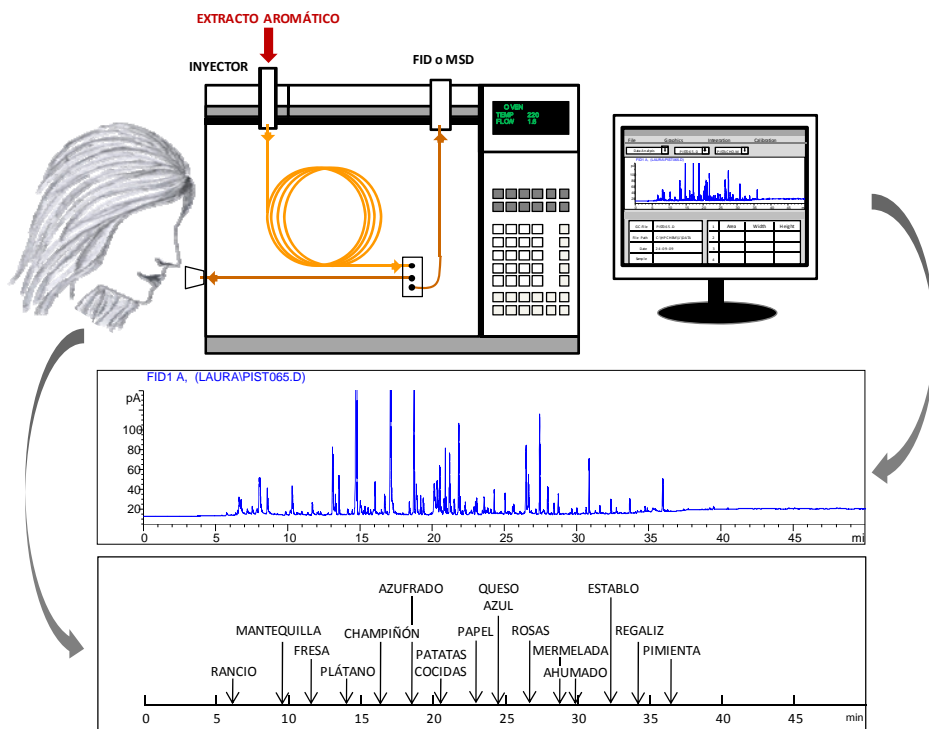


Figura 3.1. Esquema del análisis cromatográfico-olfatométrico

En un análisis por GCO es necesario introducir un extracto aromático representativo del producto a analizar en el cromatógrafo de gases a través del puerto de inyección. Tras la separación de los distintos componentes de la mezcla en



la columna capilar cromatográfica, a la salida de la misma se divide el flujo. Una parte del efluente se dirige al detector químico (FID o MSD) mientras que la otra va hacia el puerto olfatométrico localizado fuera del cromatógrafo y donde se sitúa un analista.

En los primeros estudios en los que se empleó la GCO, se olía el efluente que salía directamente del cromatógrafo. Pero éste era un gas seco y muy caliente, lo que provocaba la deshidratación nasal de quienes llevaban a cabo los análisis. Además de ser un procedimiento sumamente incómodo, disminuía la capacidad olfativa de los analistas, lo que se traducía en problemas de reproducibilidad. Por ese motivo, en 1971 se diseñó el primer cromatógrafo de gases con detector olfatométrico “real”, en el que se mezclaba el efluente caliente que salía de la columna con aire humidificado [8] (aunque aún hoy en día hay algunos analistas que trabajan oliendo ese efluente sin humidificar). Desde entonces se han introducido distintas mejoras y actualizaciones en la instrumentación para hacer más cómodo y ergonómico el análisis. También para facilitar el registro de los datos y asegurar la correcta transferencia de los odorantes hasta el “*sniffer*” o cono olfativo sin pérdidas por la condensación. En esencia, el sistema aquí descrito es el que se utiliza actualmente en casi todos los detectores olfatométricos.

De esta forma, los compuestos que presentan olor pueden distinguirse entre todos los volátiles de un alimento. Sin embargo, la cromatografía de gases-olfatometría por sí sola no es suficiente. Cuando se trabaja en el campo del aroma es necesario identificar los odorantes más potentes, determinar cuál es la importancia relativa de cada compuesto en el aroma global. Sólo así se puede averiguar quiénes son los “*key odorants*”, las sustancias a las que se debe el que cada producto huela como lo hace. Por este motivo, desde la aparición de la GCO se han desarrollado distintas técnicas olfatométricas con el fin de evaluar la importancia sensorial de los compuestos aromáticos. Cada una de estas técnicas presenta sus ventajas e inconvenientes [9-11], y debe ser el analista quien, en función de sus objetivos, elija una u otra.

### 3.2.1.- Las técnicas olfatométricas

En 1957, poco después de la invención de la cromatografía de gases, Patton y Josephson [12] propusieron relacionar la concentración de un compuesto con su umbral sensorial mediante un valor que expresara la efectividad aromática. Pero no fue hasta 1963 (un año antes del desarrollo de la GCO), cuando Rothe y Thomas [13] evaluaron por vez primera la contribución sensorial de un compuesto al aroma de una sustancia al calcular su “*valor de aroma*”: el cociente entre su concentración en la matriz y su umbral de percepción en dicha matriz. Así, para un determinado alimento, los compuestos olorosos con un valor de aroma superior a la unidad serán los que más influirán en el aroma de ese alimento, contribuyendo tanto más cuanto mayor sea el valor. Sin embargo, esta forma de evaluar la importancia sensorial de los odorantes requiere una cuantificación y una determinación del umbral de percepción para cada compuesto en cada matriz, lo que implica un trabajo largo y tedioso que, cuando no sea posible la cuantificación, no podrá llevarse a cabo [4]. Además, tal y como ya se explicó en el apartado 2.2.4 de esta tesis doctoral, el cálculo de los valores de aroma no tiene en cuenta los efectos sinérgicos y antagónicos que pueden darse entre compuestos. También correlaciona linealmente concentración e intensidad percibida, cuando, en realidad, la relación entre estos parámetros es exponencial.

De ahí que, con el paso de los años, se haya intentado estimar la contribución sensorial de los diferentes odorantes al aroma de un determinado producto de una forma más sencilla que calculando los valores de aroma para cada uno de esos odorantes. Para ello se han desarrollado distintas técnicas olfatométricas que recopilan y procesan los datos obtenidos a través de la GCO, y que se clasifican en cuatro grupos en función del tipo de medida que lleven a cabo: las técnicas de dilución, las técnicas de frecuencia de detección, las técnicas de tiempo-intensidad y las técnicas de intensidad posterior.

En el artículo que se adjunta al final de este capítulo, titulado “*La cromatografía de gases con detector olfatimétrico: una herramienta esencial para el análisis del*

*aroma de bebidas alcohólicas*”, y publicado en la revista **Cerveza y Malta 2009; XLVI (2); 182: 49-62**, se detallan todas estas técnicas con sus ventajas e inconvenientes, por lo que a continuación, éstas se describen únicamente de forma somera.

### Las técnicas de dilución

En estas técnicas, el extracto aromático obtenido se analiza mediante GCO para determinar los tiempos de retención en los que aparecen olores. A continuación, se diluye sucesivamente dicho extracto (normalmente, con el mismo disolvente empleado en su obtención), y se analiza cada dilución olfatométricamente hasta llegar a aquella en la que no se detecta ningún olor en el efluente de la columna cromatográfica. Es decir, hasta que la concentración del odorante que origina el olor es inferior a su umbral de percepción. Para cada uno de los olores percibidos inicialmente se determina entonces su *factor de dilución* (FD): la última dilución en la que se ha detectado su olor. Cuanto mayor es el FD de un olor (o más alta es la dilución en la que éste se ha detectado por última vez), mayor es su contribución al aroma del producto que se está analizando [9-11].

El CHARM (*Combined Hedonic Aroma Response Measurements*), desarrollado por Acree *et al.* en 1984 [14] y el AEDA (*Aroma Extract Dilution Analysis*), desarrollado en 1987 por Grosch *et al.* [15, 16], son las dos técnicas de dilución más importantes. En la primera, los analistas deben describir el olor que detectan e indicar el momento en el que éste empieza y acaba. La segunda es aún más sencilla, ya que en ella, los analistas sólo tienen que describir el olor percibido.

Dentro de las técnicas de dilución también se engloba el AECA (*Aroma Extract Concentration Analysis*) desarrollado en 1997 por Kerschler y Grosch [17] y en el que se analizan mediante GCO concentraciones sucesivas del extracto obtenido. Mientras que en el AEDA los compuestos volátiles se extraen de la matriz e inicialmente se concentran para conseguir el extracto que posteriormente se irá diluyendo, en el AECA, dichos compuestos se aíslan de la matriz y pasan a analizarse por GCO. Luego se elimina de forma sucesiva el disolvente, de manera que el extracto se va

concentrando. De cada paso de concentración se realiza un análisis olfatométrico. De este modo se evitan posibles pérdidas de odorantes por la dilución sucesiva del extracto aromático. También se pueden determinar los olores que se pierden durante la concentración.

### **Las técnicas de frecuencia de detección**

Estas técnicas fueron empleadas por primera vez en 1993 por Linssen *et al.* [18], aunque no fue hasta 1997 cuando Pollien *et al.* [19] desarrollaron y formalizaron el método. En ellas, un panel de analistas analiza un mismo extracto aromático mediante GCO. Para cada individuo se registran los tiempos de retención en los que se detectan olores y la descripción y duración de los mismos. Tras los análisis, se determina el número de analistas que perciben cada olor, de manera que los olores detectados con mayor frecuencia son los que presentan una mayor importancia relativa. Esto se relaciona a su vez con una mayor intensidad aromática. Así se puede dibujar un “*aromagrama*”, un perfil aromático del producto analizado en el que se enfrenta la frecuencia de detección (en %) con los tiempos de retención. En este aromagrama, mientras la altura del pico (que se denomina NIF: *nasal impact frequency*) corresponde al número de analistas que han detectado un olor a ese tiempo de retención, el área se relaciona con la duración del olor (y se denomina SNIF: *surface of nasal impact frequency*) [9-11].

### **Las técnicas de tiempo-intensidad**

En las técnicas de tiempo-intensidad, los analistas deben evaluar la intensidad del olor percibido, así como describirlo y registrar su duración. La primera técnica de estas características fue desarrollada en 1990 por McDaniel y sus colaboradores [20, 21] y la denominaron OSME. En ella, el analista evalúa la intensidad del olor en un rango de 0 (intensidad nula) a 15 (máxima intensidad) moviendo un indicador electrónico conectado a un sistema informático a lo largo de una escala de 150 mm. Al enfrentar las intensidades de los olores con el tiempo de retención se obtiene un “*osmeograma*”, una representación gráfica de la importancia sensorial de los

compuestos en el aroma global de la sustancia. Pero esta técnica presenta algunas dificultades para los analistas, sobre todo a la hora de marcar la intensidad utilizando el dispositivo indicador. Por ese motivo se desarrolló posteriormente la *Finger Span Cross-modality Matching* (FSCM), otra técnica en la que el analista señala la intensidad del olor percibido, pero esta vez separando el dedo pulgar del índice o el corazón mediante un aparato: a mayor intensidad, mayor distancia entre los dedos [22, 23]. Y, aunque en estas técnicas se reduce considerablemente el tiempo de análisis con respecto a las de dilución, la subjetividad de los analistas está más presente [9-11].

### **Las técnicas de intensidad posterior**

Como en las anteriores, en estas técnicas también se mide la intensidad del olor, pero en una escala previamente fijada y una vez que el odorante ha eluido de la columna cromatográfica. El análisis olfatométrico lo realiza un panel de analistas. Para un olor, el valor de intensidad que se le asigna es la media de las intensidades proporcionadas por cada individuo, con lo que se reduce la subjetividad. Sin embargo, el mayor problema que presenta esta técnica es el uso de la escala por parte de los analistas: la percepción de la misma difiere considerablemente de un individuo a otro y no es posible proporcionar los valores de referencia mientras se está llevando a cabo el análisis olfatométrico [9-11].

### **3.2.2.- Limitaciones de la GCO**

Todas las técnicas olfatométricas desarrolladas presentan, como ya se dijo anteriormente, ventajas e inconvenientes. Además, cada una de ellas se basa en principios diferentes, por lo que su aplicación a una misma muestra proporciona también resultados diferentes. Así, compuestos con umbrales de detección muy altos pueden presentar FD obtenidos por AEDA y valores CHARM muy bajos, pero unas respuestas muy altas si se aplican las técnicas de frecuencia de detección o de tiempo-intensidad. O compuestos con el mismo FD para AEDA e idéntica frecuencia de

detección pueden presentar valores CHARM muy distintos en función de que eluyan durante más o menos tiempo [10]. De este modo, según los objetivos que se busquen o los requerimientos que se impongan, será más adecuado emplear una técnica u otra, para seleccionar y clasificar los odorantes de acuerdo con su potencia y/o su intensidad aromática [24].

De forma general, las técnicas más rápidas son las de frecuencia de detección, seguidas por las de tiempo-intensidad, mientras que las de dilución requieren tiempos de análisis considerablemente más largos. En cuanto a la facilidad para llevarlas a cabo, las de frecuencia de detección son las más sencillas, seguidas por las de dilución. Las más complejas son las de tiempo-intensidad porque requieren un panel de analistas adecuadamente entrenado [25].

Todas estas técnicas han demostrado estar correlacionadas entre sí y presentar sensibilidades similares [25, 26]. Sin embargo, si se comparan la técnica de frecuencia de detección y la de intensidad posterior, la primera presenta una mayor repetitividad, mientras que la segunda discrimina mejor entre los distintos niveles de concentración de los odorantes [26]. No obstante, comparando los resultados obtenidos a partir de una evaluación sensorial con los resultados de intensidad/concentración que proporciona cada una de las dos técnicas, todos son similares [27].

En las técnicas de dilución, un analista puede no percibir un odorante en una dilución, pero sí detectarlo en diluciones superiores [28], motivo por el cual, las técnicas de frecuencia de detección y las que miden intensidades son más adecuadas a la hora de comparar muestras diferentes o realizar análisis cuantitativos [27, 29, 30]. Sin embargo, y aunque estos dos tipos de técnicas sí que cumplen las leyes psicofísicas de la percepción, la información que proporcionan no es una medida real del papel que juega un compuesto en el aroma de una sustancia, porque no se puede asegurar que la concentración de ese compuesto que llega a la nariz del analista durante el análisis cromatográfico sea la misma que cuando se huele directamente el

producto. Por su parte, las técnicas de dilución son las idóneas si lo que se pretende es jerarquizar los odorantes en función de su contribución sensorial al aroma, ya que, según el principio en el que se basan, potencia odorífera e intensidad del estímulo aromático no tienen por qué estar directamente relacionadas [10].

Pero, además de las propias limitaciones que presenta cada una de las distintas técnicas olfatométricas, es necesario considerar aquéllas que aparecen por el hecho de emplear la nariz humana como detector cromatográfico y que principalmente influyen sobre la reproducibilidad del análisis [10, 31]. Es el caso del cansancio y la saturación sensorial que puede sufrir el analista y que afectan negativamente a la calidad de los datos obtenidos. Para evitarlo, deben acortarse los tiempos de análisis. También hay que tener en cuenta que el orden de elución, la identidad aromática y la intensidad percibida para un determinado compuesto pueden afectar de forma directa a la intensidad con la que se percibe el odorante que eluye inmediatamente después de él. Una manera de eliminar este efecto es modificar la elución de los compuestos variando algunos parámetros cromatográficos (temperatura, presión) o cambiando el tipo de columna empleada. Además, el orden en el que eluyen los compuestos puede llegar a memorizarse, lo que origina fenómenos de anticipación: se sabe qué olor será el siguiente en detectarse y se le “espera”, lo que reduce la objetividad. Por ese motivo se debe alternar el orden de los analistas o introducir blancos entre las muestras.

Asimismo, el ambiente en el que se realiza el análisis debe reunir una serie de requisitos, ya que puede inducir a que se cometan errores de percepción [10, 31]. Los ruidos, las distracciones, los olores extraños o las condiciones de análisis poco confortables deben evitarse. Lo ideal es llevar a cabo el análisis olfatométrico en una habitación aislada y tranquila, con una presión de aire positiva para evitar la entrada de olores extraños y que cuente con un sistema de aireación que filtre el aire. Para asegurar el confort del analista, la temperatura debe ser la adecuada y la posición en la que se realiza el análisis, cómoda, preferiblemente sentado. Para evitar la deshidratación de las fosas nasales, el eluyente debe mezclarse con aire humidificado.

También hay que tener en cuenta la sensibilidad de los analistas y si han sido entrenados o no [10]. Cada individuo tiene un umbral de detección distinto para cada compuesto, con lo que los valores de percepción pueden variar mucho entre analistas. Además, como ya se explicó en el apartado 2.1.3 de esta tesis doctoral, hay personas que presentan “anosmias” y que, aún sin haber perdido el sentido del olfato, son incapaces de detectar el olor de algunos compuestos o de algunas familias de compuestos. Esto supone un problema en el caso de las técnicas de dilución, donde sólo se emplean uno o dos analistas, aunque en el resto de técnicas se solventa utilizando un panel de analistas. En cuanto al entrenamiento de los individuos, éste es un proceso indispensable para la obtención de resultados fiables. Sólo tras un correcto entrenamiento se mejoran la precisión y exactitud de los datos olfatométricos obtenidos y se adquiere un vocabulario común que facilita el entendimiento a la hora de describir las cualidades aromáticas percibidas por los distintos individuos.

En última instancia, caracterizar adecuadamente el aroma de un producto mediante la cromatografía de gases-olfatometría depende del extracto aromático obtenido. La técnica de pretratamiento de muestra empleada para aislar los compuestos volátiles de la matriz debe proporcionar un extracto representativo del aroma que se quiera analizar. Sin embargo, esto no es sencillo, dado el elevado número de volátiles presentes en cada alimento, con muy diferentes propiedades físicas y químicas, y el amplio rango de concentraciones en las que pueden aparecer.

### **3.2.3.- Obtención de extractos aromáticos representativos**

Cuando se habla de la representatividad de un extracto aromático se hace referencia al hecho de que ese extracto debe contener, no sólo los volátiles responsables del aroma del producto, sino que, además, esos volátiles deben aparecer en las mismas proporciones en las que se encuentran en la matriz. Pero la representatividad del extracto depende del objetivo de la investigación, por lo que no hay que considerarla en términos absolutos. Porque no es lo mismo querer cuantificar



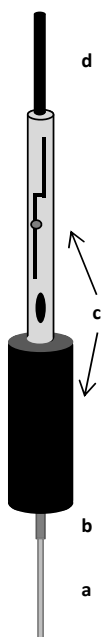
una determinada familia de compuestos, para lo que se necesitará que la recuperación de los analitos de interés sea elevada, que comparar el aroma de dos muestras diferentes, donde lo que se busca es extraer los odorantes más importantes y característicos.

Como ya se mencionó en el apartado 2.3.2, y más concretamente en el subapartado 2.3.2.1 que trata sobre las técnicas de pretratamiento, no hay una única técnica ideal para la extracción de los volátiles de un alimento. Son varios los factores que hay que tener en cuenta y, en función de la matriz, de los compuestos a analizar y, sobre todo, de los objetivos perseguidos, será más conveniente emplear una y no otra, aunque casi siempre será necesario llegar a un compromiso [32]. En cualquier caso, hay que tener presente que todas las técnicas presentan ventajas e inconvenientes [9-11], por lo que debe ser el analista quien evalúe la situación, valore cada uno de los puntos a considerar y finalmente, decida.

En ese mismo apartado del capítulo 2 también se describen los distintos métodos que se emplean habitualmente en la obtención de extractos aromáticos, con lo que a continuación se explican con más detalle únicamente las dos técnicas que han sido utilizadas a lo largo del desarrollo experimental de esta tesis doctoral: la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción directa con disolvente (DSE) seguida de *high-vacuum transfer* (HVT).

### **3.2.3.1.- Microextracción en fase sólida**

La microextracción en fase sólida, o *solid-phase microextraction* (SPME), es una técnica de preparación de muestra desarrollada a principios de los años 90 por Pawliszyn y sus colaboradores, en la que no se emplean disolventes orgánicos y que permite la extracción y concentración de los analitos de interés en una sola etapa, reduciéndose de forma considerable el tiempo de análisis [33, 34].



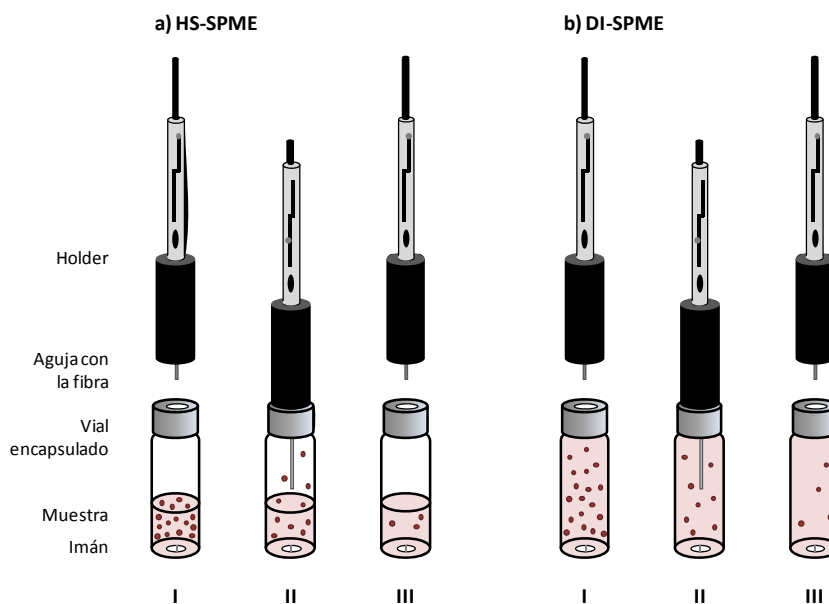
**Figura 3.2.** Esquema del dispositivo de la SPME

En ella, se utiliza una fibra de sílice fundida de pequeñas dimensiones. Como puede observarse en la **Figura 3.2**, la fibra está recubierta por una fase estacionaria polimérica (en algunos casos, mezclada con un sólido adsorbente), que es capaz de retener los analitos (**a**). Va protegida en el interior de una aguja de acero inoxidable (**b**), la cual, a su vez, se instala en una jeringa modificada o *holder* (**c**) mediante un simple sistema de rosca. Al presionar hacia abajo el émbolo del *holder* (**d**) se desenvaina la fibra del interior de la aguja, con lo que la fase estacionaria de la fibra queda expuesta a la muestra. Al subir el émbolo, la fibra vuelve al interior de la aguja.

Esta técnica no precisa de ninguna instrumentación adicional, a parte del *holder*, y puede aplicarse de forma sencilla a muestras sólidas, líquidas o gaseosas. Además, y en comparación con otras técnicas de pretratamiento, la SPME emplea cantidades de muestra considerablemente menores. Como se muestra en la **Figura 3.3**, se puede llevar a cabo de dos formas diferentes. En la primera (**a**), la fibra se expone al espacio de cabeza o *headspace* de la muestra (HS-SPME), con lo que la extracción tiene lugar en la fase gaseosa. Es el procedimiento más utilizado, recomendado para analizar matrices complejas o cuando se trabaja con compuestos volátiles. En el segundo (**b**), la fibra se sumerge directamente en la muestra (DI-SPME), por lo que la extracción se lleva a cabo en la fase líquida. Se utiliza con analitos no muy volátiles y muestras limpias, pero aún así, esta forma de extracción reduce el tiempo de vida útil de la fibra, por lo que su empleo no está tan extendido como el de la HS-SPME.

En ambos casos, el proceso de microextracción es el mismo. Una vez introducida la muestra junto con un pequeño imán en un vial, éste se cierra herméticamente con

un *septum* (paso I de la **Figura 3.3**). Tras acondicionar o limpiar la fibra, ésta se introduce en el vial atravesando el *septum* con la aguja que la aloja. A continuación, se empuja el émbolo del *holder* hasta que la fibra queda fuera de la aguja y expuesta al *headspace* o a la propia muestra. Entonces tiene lugar la extracción de los analitos, favorecida por la agitación constante de la muestra por el imán (paso II de la **Figura 3.3**). Según las características de la fase estacionaria, dicha extracción seguirá un proceso de adsorción y/o absorción. Una vez alcanzado el equilibrio entre las fases, la extracción y concentración simultáneas finalizan, con lo que sólo resta subir el émbolo del *holder* para guardar la fibra dentro de la aguja. Por último, se retira ésta del vial (paso III de la **Figura 3.3**) y se procede a la desorción posterior de los analitos de la fibra.



**Figura 3.3.** Esquema del procedimiento de la SPME, (a) sobre el espacio de cabeza y (b) directa.

El proceso de la desorción varía en función del tipo de separación cromatográfica que se vaya a llevar a cabo: mientras que para la cromatografía líquida (HPLC) es necesario utilizar un disolvente en una interfase previa al cromatógrafo de líquidos, en el caso de la cromatografía de gases la desorción es térmica [35]. En este segundo

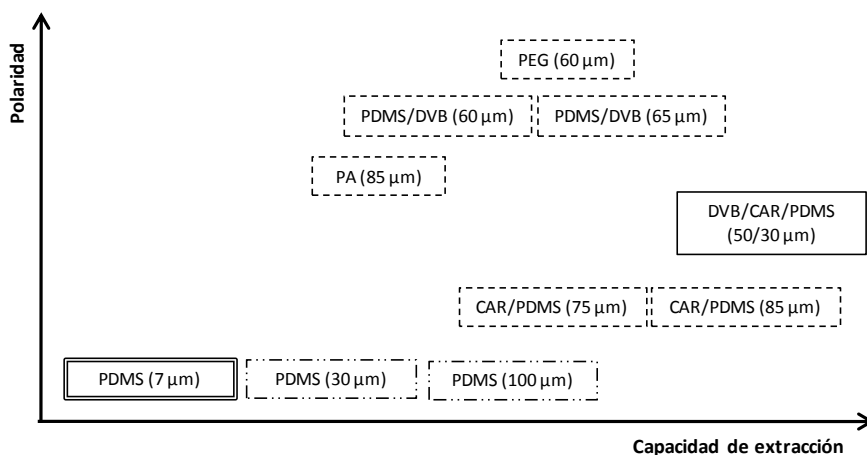
supuesto únicamente hay que introducir la aguja en el inyector del cromatógrafo atravesando el *septum* y empujar el émbolo del *holder* para exponer la fibra a una temperatura elevada (200-300 °C). La desorción de los analitos es instantánea, y estos pasan directamente a la columna cromatográfica. A su vez, la exposición de las fibras a las altas temperaturas del inyector también es necesaria para el acondicionamiento de las mismas antes de su primer uso y para su limpieza entre análisis.

El fundamento teórico de la microextracción en fase sólida se basa en un proceso de equilibrio o partición de los analitos entre múltiples fases. Si se considera la DI-SPME, el equilibrio se establece entre la matriz y la fase estacionaria de la fibra. Pero si hablamos de la HS-SPME hay que considerar los equilibrios que se establecen entre la matriz, el *headspace* y la fase estacionaria [34, 36, 37]. En cualquier caso, distintos parámetros influyen en estos equilibrios y, por lo tanto, en la cantidad de analito que puede extraerse: el tipo de recubrimiento de la fibra, el tiempo y la temperatura de extracción, el volumen y la fuerza iónica de la muestra, el tipo de analito, etc. Por este motivo, y con el objetivo de obtener los mejores resultados posibles, es necesario optimizar cada una de estas variables antes de llevar a cabo un análisis mediante SPME.

### Tipos de fibras

En el mercado existen varios tipos de fibras. Se diferencian en el grosor y la polaridad de sus fases estacionarias, lo que determina la cantidad y el tipo de analito que permiten extraer. Además, según cómo estén inmovilizadas las capas de fase estacionaria sobre la fibra de sílice fundida, encontramos fases ligadas, no ligadas, parcialmente entrecruzadas o fuertemente entrecruzadas (**Figura 3.4**). Las fases no ligadas son estables en algunos disolventes orgánicos miscibles con el agua, aunque pueden hincharse si se usan disolventes apolares. Por su parte, las fases ligadas son estables en todos los disolventes orgánicos, a excepción de algunos apolares. Y en cuanto a las fases entrecruzadas, todas, tanto las parciales, como las fuertemente

entrecruzadas, son estables en la mayoría de los disolventes orgánicos miscibles con el agua, además de en algunos apolares [35].



**Figura 3.4.** Propiedades de las fases estacionarias de las fibras de SPME comerciales. PDMS: polidimetilsiloxano; DVB: divinilbenceno; PEG: carbowax-poliétilenglicol; PA: poliacrilato; CAR: carboxen. Fases 

ligadas
---------

; 

no ligadas
------------

; 

parcialmente
--------------

 y 

fuertemente
-------------

 entrecruzadas.

Las fibras serán tanto más afines a un tipo de analito cuanto más semejantes sean a dicho analito en términos de polaridad. De este modo, las fibras apolares de polidimetilsiloxano (PDMS) están recomendadas para la extracción de compuestos volátiles apolares, mientras que las fibras polares de poliacrilato (PA) son más efectivas para la extracción de compuestos muy polares. Respecto a las fibras con mezclas de fases estacionarias, los efectos de adsorción/absorción y distribución de la fase estacionaria se ven mutuamente potenciados, con lo que se incrementa la capacidad de extracción [35, 36]. Así, las fibras de polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB) se utilizan para la extracción de compuestos volátiles polares de bajo peso molecular. Las de divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) son aptas para extraer un amplio rango de analitos con valores de peso molecular entre 40 y 275.

En cuanto al grosor de la fase estacionaria, se ha comprobado que los recubrimientos más gruesos favorecen la extracción de los compuestos más volátiles.

Las fases más finas son más efectivas con los semivolátiles. Además, las fibras con fases estacionarias más gruesas presentan una mayor sensibilidad al poder extraer más cantidad de analito. Sin embargo, también necesitan de tiempos de extracción más largos para alcanzar el equilibrio, puesto que la difusión de los analitos en la fase estacionaria resulta más difícil [34].

Además de las fibras comerciales anteriormente descritas, han comenzado a desarrollarse nuevas fases estacionarias, como los *molecularly imprinted polymers* (MIPs) o los materiales de acceso restringido (RAM) [38, 39], con el objetivo de incrementar la afinidad y selectividad de la SPME. Los primeros consisten en receptores sintéticos que únicamente interaccionan con las moléculas que presentan una determinada geometría y grupo funcional. Los segundos son materiales especiales capaces de fraccionar la muestra, de forma que los componentes más grandes de la matriz (proteínas, ácidos nucleicos, etc.) no son adsorbidos, mientras que los analitos de interés (de bajo peso molecular) son extraídos y concentrados en el interior de la fase estacionaria.

### **Variables de extracción**

Como ya se ha comentado previamente, la eficacia de la extracción no sólo depende del tipo de fibra empleada, sino también de otros factores que influyen en ella y que deben ser optimizados: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación, la fuerza iónica, el pH y el volumen de muestra.

El tiempo de extracción viene determinado, principalmente, por la velocidad de agitación y por el coeficiente de partición de los analitos entre la fase estacionaria y la matriz de la muestra, si se trata de una extracción directa (DI-SPME), o entre la fase estacionaria, la matriz y la fase gaseosa que hay sobre la muestra, si es una extracción sobre el espacio de cabeza (HS-SPME). En cualquier caso, y aunque la sensibilidad es máxima en el punto de equilibrio, no es necesario alcanzar estas condiciones para obtener unos buenos resultados en cuanto a precisión y exactitud, ya que existe una relación lineal entre la cantidad de analito retenido por la fibra y su concentración

inicial en la matriz. Sin embargo, en estas condiciones de no-equilibrio hay que controlar minuciosamente el tiempo a lo largo de las distintas extracciones, para asegurar la repetitividad del proceso [35].

Otro de los parámetros que es importante controlar, dado que afecta tanto a la sensibilidad como a la cinética de extracción, es la temperatura, de la cual dependen los coeficientes de partición. En el caso de la HS-SPME, aunque el aumento de la temperatura favorece el paso de más analitos de la matriz al *headspace*, también hace que disminuyan los coeficientes de partición entre la fibra y la fase gaseosa, ya que el proceso de extracción de la fibra es exotérmico [35, 36]. Para solventar este problema, y en el caso de que sea necesario calentar considerablemente la muestra, Zhang y Pawliszyn [40] desarrollaron un dispositivo complejo que enfría la fibra mediante CO<sub>2</sub> líquido y que se ha probado en la extracción de compuestos en distintas matrices con muy buenos resultados [41].

En cuanto a la agitación de la muestra, ésta acelera el transporte convectivo de los analitos de la matriz a la fibra. Y, aunque al aumentar la velocidad de agitación disminuye progresivamente el tiempo de extracción necesario para llegar al equilibrio, una agitación excesiva e incontrolada puede provocar cambios en el tiempo que se tarda en alcanzar el equilibrio, con la consiguiente disminución de la precisión [35].

Otro de los factores que mejoran la eficacia de la extracción es la variación de la fuerza iónica de las muestras mediante la adición de sales solubles. El cloruro sódico, el sulfato amónico y el carbonato potásico son las sales más utilizadas. En principio, si las muestras se sobresaturan con ellas, se incrementa la extracción de los compuestos apolares. Sin embargo, es preferible adicionarlas cuando se trabaja con la HS-SPME, ya que, si se utiliza la DI-SPME, la fibra puede terminar dañada [35, 36].

En cuanto al pH, él es el responsable de la forma iónica en la que se encuentran los analitos en la muestra, con lo que también influye en la eficacia de la extracción. Cambios en su valor pueden mejorar la sensibilidad de la SPME para analitos con cierto carácter ácido o básico. En general, la muestra se acidifica para extraer los

analitos ácidos y se alcaliniza para extraer los básicos, aunque siempre teniendo en cuenta que, si se trabaja con la fibra sumergida, valores extremos de pH pueden dañarla [35].

Y por último hay que considerar el volumen de muestra. Cuando se trabaja con HS-SPME, es necesario minimizar el volumen de la fase gaseosa para favorecer el que los analitos se acumulen en el espacio de cabeza, y así aumentar la sensibilidad. Si se trabaja con DI-SPME y la constante de distribución del analito entre la fibra y la matriz es elevada, entonces también es necesario emplear volúmenes de muestra considerables, aunque, si estos volúmenes son lo suficientemente grandes, la cantidad de analito extraída es independiente de esta variable [34].

### **Variables de desorción**

Si los analitos extraídos y concentrados por la fibra de SPME se van a analizar mediante cromatografía de gases, su desorción es térmica y se lleva a cabo directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo. Los principales factores que afectan a la eficacia de dicha desorción son la volatilidad de los analitos, el grosor de la fase estacionaria de la fibra, la temperatura del inyector, y el tiempo de exposición de la fibra al mismo [35, 42].

Normalmente, la temperatura del inyector para proceder a la desorción se encuentra entre 150 y 250 °C, aunque, de forma general, el valor óptimo coincide con el punto de ebullición del analito menos volátil. Para mejorar la resolución cromatográfica, el inyector debe operar en el modo *splitless* y además se debe emplear un *liner* estrecho, de 0,75 mm de diámetro, para evitar el ensanchamiento de los picos cromatográficos. El tiempo de exposición de la fibra al inyector depende de la temperatura, pero se puede decir que la desorción es instantánea, y que en unos pocos segundos todos los analitos han sido desorbidos. Sin embargo, es aconsejable mantener la fibra expuesta durante algunos minutos para limpiarla y eliminar el posible efecto memoria en posteriores análisis [35, 36].



### **Aplicación de la SPME en el análisis del aroma de alimentos**

La microextracción en fase sólida se empleó inicialmente como técnica de extracción de contaminantes orgánicos en agua [33, 43], aunque poco después de su aparición comenzó a utilizarse como técnica de pretratamiento de muestras para el análisis del aroma de los alimentos. Como se ha comentado anteriormente, esto se debe a su sencillez instrumental y fácil aplicación sobre muestras tanto sólidas, como líquidas o gaseosas. También, a que proporciona buenos resultados cuantitativos y cualitativos, y supone un considerable ahorro de tiempo con respecto a las técnicas tradicionales gracias a la extracción y concentración simultáneas [44, 45]. Además, si la SPME se utiliza sobre el espacio de cabeza de la muestra, el extracto aromático que se obtiene es lo más parecido a lo inhalado por un individuo cuando huele un alimento, porque se trata de la fracción realmente volátil que llega hasta sus fosas nasales.

Por este motivo, la SPME se ha aplicado en el análisis tanto del aroma, como de los *off-flavors* u olores anómalos de muy distintos productos alimenticios: frutas y vegetales, cereales, hierbas y especias, bebidas (alcohólicas o no), aceites, salsas, carnes y pescados, derivados lácteos, etc. [35, 44-47]. Pero no se ha utilizado únicamente para determinar los compuestos mayoritarios del aroma. También ha demostrado ser una técnica fiable, con una alta sensibilidad y reproducibilidad, en la detección de odorantes minoritarios: compuestos azufrados [48], pirazinas [49], TCA [50], etc.

Algunos de estos odorantes presentan olores muy fuertes y característicos por lo que, a pesar de aparecer en concentraciones traza, juegan un importante papel en el aroma global del producto en el que se encuentren. De ahí que sea necesaria su determinación. En muchos casos, además de las bajas concentraciones, estos compuestos presentan otros problemas asociados, como inestabilidad, elevada reactividad de sus grupos funcionales, baja volatilidad, etc., pero que pueden solventarse mediante derivatización. Y la SPME permite una derivatización sobre la

misma fibra de microextracción, que, en algunos casos determinados y trabajando bajo unas condiciones muy concretas, reduce el tiempo de análisis y el consumo de reactivos [51-53].

Todo esto hace de la microextracción en fase sólida una técnica de preparación de muestra con infinitas posibilidades.

### **3.2.3.2.- Extracción directa con disolvente – *High-vacuum transfer***

#### **Extracción directa con disolvente (DSE)**

Las extracciones con disolventes son técnicas ampliamente utilizadas para la obtención de extractos aromáticos de los alimentos. En ellas se produce una transferencia de los compuestos odorantes desde la matriz hasta un disolvente orgánico, pudiéndose distinguir, tal como ya se explicó en el apartado 2.3.2, entre la extracción líquido-líquido (LLE), si la muestra es líquida, y la extracción directa con disolvente (DSE), si ésta es sólida. En ambos casos, el fundamento del método es el mismo y se basa en la mezcla y agitación de la muestra con el disolvente, de forma manual o automática, para permitir la extracción de los analitos de la matriz. La eficacia de esta extracción depende del tipo de disolvente que se use, de la técnica empleada (que puede ser en continuo o en discontinuo), y del tiempo y la temperatura de extracción [54].

En el caso de la DSE, dado que se trata de matrices sólidas, normalmente es necesaria una homogeneización, un molido o un machacado de las muestras antes de llevar a cabo el procedimiento de extracción. A veces, como ocurre con las frutas frescas, incluso debe realizarse una desactivación enzimática para evitar alteraciones de la composición de la muestra [55]. Tras la extracción, se procede al decantado y filtrado de la mezcla y, posteriormente, a la concentración de la fase orgánica por evaporación de la mayor parte del disolvente, motivo por el que se prefiere el uso de disolventes con bajos puntos de ebullición.

Precisamente, uno de los puntos críticos del método es la elección del disolvente, ya que debe reunir una serie de requisitos. En primer lugar, ser capaz de extraer el mayor número de compuestos tanto polares como apolares, pero también no presentar impurezas y tener un punto de ebullición bajo [45, 55].

Los disolventes orgánicos que se emplean habitualmente son el diclorometano, el éter dietílico y distintos hidrocarburos como el pentano o el hexano, así como los freones y varias mezclas binarias de estos mismos disolventes [55, 56]. Algunos de estos disolventes, junto a sus puntos de ebullición y si son, o no, miscibles en agua, se detallan en la **Tabla 3.1**, siendo los dos primeros de la misma los más comunes a la hora de extraer aromas.

Disolvente	Punto de ebullición (°C)	Interacción con el agua
Diclorometano	45	Inmiscible/más denso que el agua
Pentano/Éter dietílico	35	Inmiscible/menos denso que el agua
Freones (mezcla halogenada)	< 45	Inmiscible/más denso que el agua
Hexano	69	Inmiscible/menos denso que el agua
Etanol	78	Miscible con el agua
Acetona	56	Miscible con el agua

**Tabla 3.1.** Disolventes más comúnmente utilizados en la DSE [55]

En general, el diclorometano puede considerarse como el disolvente más universal, ya que tiene la ventaja de no ser inflamable (lo que no ocurre con el resto de productos, a excepción de los freones), y presentar un punto de ebullición relativamente bajo. Pero si la muestra contiene alcohol, entonces se recomienda utilizar freones o hidrocarburos. De otra manera, el disolvente (caso del diclorometano o el éter dietílico) extraería el etanol [56]. Se obtendría entonces una solución diluida de volátiles en etanol y, dado que éste tiene un punto de ebullición elevado, a la hora de concentrar el extracto se perderían numerosos compuestos aromáticos junto con él. En cuanto al éter, al llevar inhibidores para evitar la

formación de peróxidos explosivos, puede dar problemas de contaminación en el análisis cromatográfico [54, 56].

La extracción directa con disolventes, y en general, todas las extracciones con disolventes, presentan numerosos inconvenientes. Entre ellas, su baja selectividad: al utilizarse los disolventes orgánicos habituales, no sólo se extraen los compuestos volátiles de la matriz, sino también todos aquellos compuestos que presentan afinidad por dicho disolvente. Estos compuestos pueden tener puntos de ebullición altos o no ser volátiles, lo que origina problemas posteriores en, por ejemplo, el análisis cromatográfico. Todo esto, además, reduce la sensibilidad del método respecto a los analitos de interés que se encuentren en concentraciones traza [45, 55]. Sin embargo, este problema puede solventarse hasta cierto punto empleando disolventes con diferentes polaridades.

También hay que tener muy presente la problemática medioambiental que supone el uso de disolventes orgánicos. Para conseguir un extracto representativo, normalmente es necesario emplear grandes volúmenes, tanto de muestra como de disolvente, pero la mayoría de estos últimos son tóxicos y/o inflamables. Además, los disolventes deben ser productos de calidad y elevada pureza para no contaminar con trazas de sus propias impurezas los extractos aromáticos que se obtengan, lo que encarece todo el proceso [45, 55]. A esto hay que añadirle la posibilidad de que se formen emulsiones, sobre todo si la presencia de lípidos es elevada. Para intentar minimizar la aparición de estas emulsiones es aconsejable aplicar una agitación suave y mantener el sistema a bajas temperaturas [55, 56].

Otro inconveniente de las extracciones con disolvente es que se requieren prolongados tiempos de análisis y una gran manipulación de las muestras, que en la DSE implica hasta una filtración. Todo esto provoca pérdidas de analitos en cada uno de los pasos de la extracción y la posibilidad de sufrir contaminaciones [45]. El paso más crítico de todo el proceso, y donde con más facilidad se producen las pérdidas de volátiles, es en la etapa final de concentración. Generalmente, y una vez que se han

separado ya las dos fases, primero es necesario el uso de sales anhidras (sulfato sódico o magnésico) para eliminar el agua que pueda haber quedado en la fase orgánica para, a continuación, proceder a su concentración. Para intentar minimizar la pérdida de compuestos volátiles y concentrar de forma adecuada grandes volúmenes de disolventes, es aconsejable el uso de columnas de fraccionamiento Kuderna-Danish o Vigreux [56].

Por último, y como en cualquier otra técnica en la que se emplee un disolvente, al inyectar el extracto obtenido aparecerá un pico cromatográfico debido al disolvente utilizado. Este pico será más o menos grande, pero en muchos casos dificultará, o incluso impedirá, la determinación de aquellos compuestos que coeluyan con él [45, 55]. Es lo que ocurre con el acetato de etilo cuando se realiza una extracción con diclorometano y está instalada una columna polar como la CP-WAX en el cromatógrafo. Sin embargo, esto puede solucionarse utilizando columnas de distintas polaridades o trabajando en el modo SIM del GC-MSD.

Pero las extracciones con disolventes también presentan numerosas ventajas. La primera, que son relativamente sencillas de llevar a cabo. Y, principalmente, que permiten utilizar mayores cantidades de muestra que otras técnicas, con lo que se extraen más analitos y se consigue una sensibilidad del método mucho mayor. Además, proporcionan buenos resultados, sobre todo si se aplican sobre muestras de base acuosa, como frutas, vegetales, zumos o bebidas alcohólicas [45, 55].

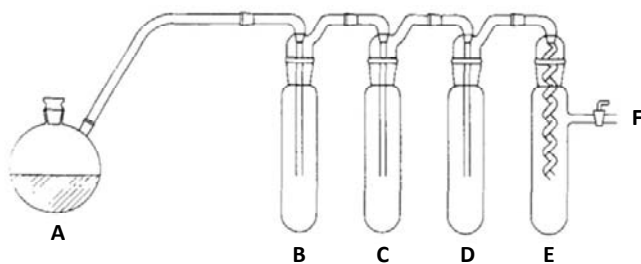
Sin embargo, muchos alimentos (como los frutos secos, los aceites vegetales, las mantequillas y margarinas, etc.) contienen elevadas cantidades de lípidos, los cuales se caracterizan por ser muy hidrofóbicos, pero solubles en disolventes orgánicos [57]. De tal manera que, si se realiza una extracción con disolventes para obtener un extracto aromático de estos productos, además de los compuestos volátiles se extraerán también los lípidos. Con el objetivo de eliminarlos y conseguir un extracto aromático sin interferencias de este tipo, es necesario aplicar otra técnica de extracción complementaria como es el *High-Vacuum Transfer* (HVT).

### **High-Vacuum Transfer (HVT)**

Gracias al *High-Vacuum Transfer* (HVT) los volátiles de un alimento, o los del extracto obtenido mediante el uso de disolventes, se destilan aplicando un alto vacío y temperaturas moderadas [58]. De esta manera, todos aquellos componentes no volátiles, como es el caso de los lípidos, quedan fuera del extracto final. Además, dado que las condiciones de destilación no son agresivas (al contrario de lo que ocurre en una destilación tradicional, con o sin arrastre de vapor), no se produce la formación de artefactos por la degradación térmica [59].

El principio del *High-Vacuum Transfer* fue propuesto en 1970 por Weurman *et al.* [60]. El objetivo era desarrollar una técnica capaz de destilar el extracto aromático o las propias matrices alimenticias, pero, precisamente, minimizando la formación de artefactos. La idea consistía en *transferir* (“*transfer*”, en inglés) únicamente los compuestos volátiles de un recipiente a otro pertenecientes al mismo sistema. Para ello era necesario conectar ambos recipientes entre sí por un tubo de vidrio y establecer una diferencia de temperatura extrema entre ellos, a la vez que todo el sistema era sometido a presión reducida. De esta manera se evitaría la presencia de los compuestos no volátiles en el extracto destilado.

Basándose en esta técnica, Schieberle y Grosch propusieron en 1985 un equipo de destilación (**Figura 3.5**) [61]. En él, el extracto aromático procedente de una extracción líquido-líquido o sólido-líquido previa era depositado en un matraz de dos bocas (**A**), el cual estaba sumergido en un baño de agua a 50 °C.



**Figura 3.5.** Equipo de destilación propuesto por Schieberle y Grosch [61]

A través de la salida marcada como **F**, se aplicaba el vacío ( $10^{-2}$  Torr.). Gracias a las trampas utilizadas: **B** (hielo/agua), **C** (mezcla de acetona/hielo seco), **D** y **E** (nitrógeno líquido), se lograba que la diferencia de temperatura entre el matraz y la última trampa ( $-190$  °C) fuera lo suficientemente pronunciada como para llevar a cabo el proceso. Al final, las distintas fracciones condensadas que se obtenían en las dos últimas trampas, se juntaban, se secaban y se concentraban hasta el volumen deseado utilizando una columna Vigreux.

Inicialmente, este equipo se empleaba únicamente para destilar extractos aromáticos obtenidos mediante el uso de disolventes, pero las posteriores mejoras introducidas permitieron aplicarlo directamente sobre aceites vegetales para extraer sus volátiles [62-64]. Entre estas mejoras estaba el someter al matraz con el extracto o la muestra a destilar a agitación magnética constante, para favorecer la salida de los volátiles. También se recubrió con una camisa el tubo de vidrio que conectaba el matraz y la primera trampa, para hacer circular por ella agua a la misma temperatura que el agua del baño. Así se evitaba la condensación de los volátiles antes de llegar a las trampas. Por último, se diseñó un nuevo conector entre el matraz y el tubo encamisado que protegía al sistema de las salpicaduras que se producían en el matraz (**Figura 3.6**).

Este conector consistía en una pieza de vidrio cerrada, pero agujereada en la parte que quedaba dentro del matraz, y con un gancho hueco en su interior, también de vidrio. De esta manera, únicamente los volátiles podían pasar a través de los agujeros de la pieza y atravesar el ganchito para luego subir por el tubo encamisado [64].



**Figura 3.6.** Pieza que conecta el matraz y el tubo encamisado [64]

En la actualidad, el equipo utilizado para llevar a cabo la extracción de volátiles utilizando la técnica del HVT es el que se muestra en la **Figura 3.7**, y ha sido el equipo

instrumental empleado en parte del trabajo experimental desarrollado a lo largo de esta tesis doctoral. En primer lugar se conecta el sistema a la bomba de vacío y se deja que se alcance un vacío aproximado de 5 mPa. Al mismo tiempo, las trampas se sumergen en el nitrógeno líquido contenido en los Dewars. A continuación, la muestra, o el extracto del que se quiere separar la fracción volátil, se introduce en el embudo de adición y se deja caer gota a gota sobre el matraz de dos bocas. Este matraz se encuentra sumergido en un baño de agua y está sometido a agitación magnética constante, con lo que el matraz también cuenta con un pequeño imán en su interior que mueve la muestra y ayuda a la evaporación de los volátiles.

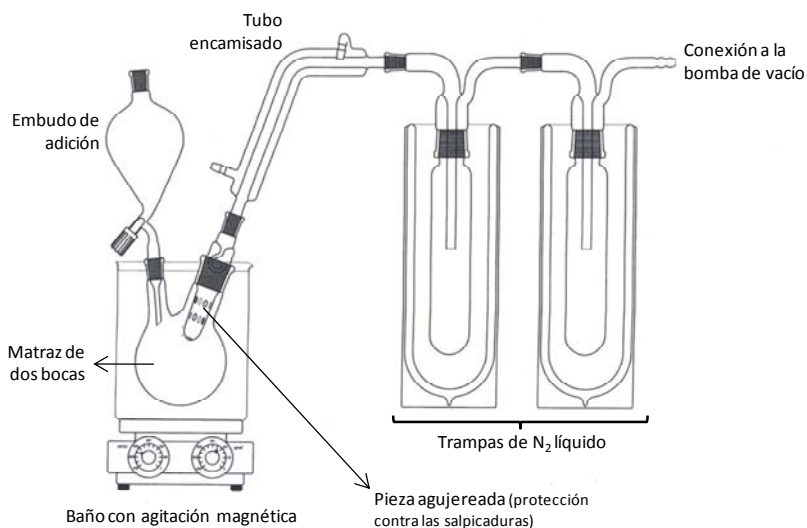


Figura 3.7. Equipo del *High-Vacuum Transfer* (HVT) [59]

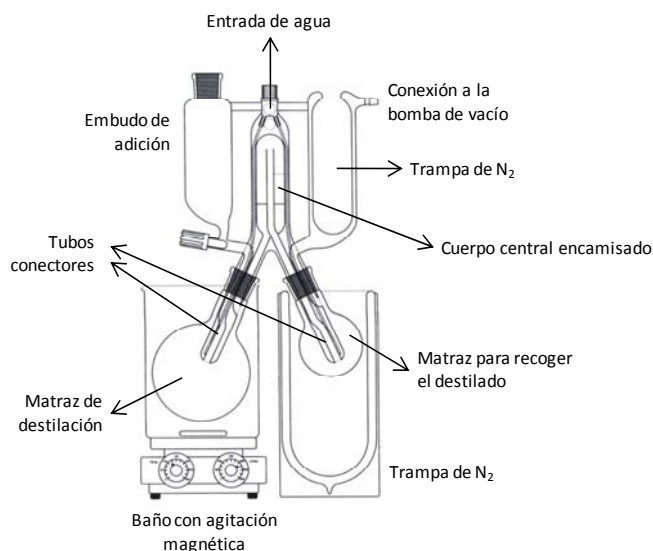
Durante la adición de la muestra se producen numerosas salpicaduras en el interior del matraz y, aunque estas salpicaduras llegar a introducirse por los agujeros de la pieza que conecta dicho matraz con el tubo encamisado, únicamente los volátiles son capaces de pasar a través del gancho situado en su parte superior. Finalmente, en la primera trampa se condensan los volátiles, que incluyen el disolvente utilizado en la extracción. La segunda trampa sirve de protección para la bomba de vacío.



Sin embargo, el aparato anteriormente descrito también presenta algunos inconvenientes [59]:

- los compuestos aromáticos con puntos de ebullición más altos pueden condensar parcialmente dentro de los tubos, antes de alcanzar las trampas;
- es aconsejable utilizar diclorometano y éter dietílico, ya que los otros disolventes pueden congelarse y obstruir los tubos y trampas;
- los extractos con altas concentraciones de grasas saturadas pueden llegar a taponar la llave de paso del embudo de adición;
- y, además, el equipo es sumamente frágil, ocupa mucho espacio y necesita tiempos de funcionamiento bastante largos.

Por eso, Engel *et al.* [59] desarrollaron un nuevo aparato de destilación en 1999 (**Figura 3.8**), más manejable, estable y seguro a la hora de trabajar con valores de vacío tan altos, y con el objetivo de extraer más rápidamente los volátiles de distintas matrices alimenticias. Es el denominado *Solvent Assisted Flavor Evaporation* (SAFE), pero cuyo funcionamiento es básicamente el mismo que el del HVT.



**Figura 3.8.** Equipo del *Solvent Assisted Flavor Evaporation* (SAFE) [58, 59]

En el SAFE, tras aplicar el vacío ( $\approx 5$  mPa), se deja gotear poco a poco sobre el matraz de destilación la muestra contenida en el embudo de adición. Así, los volátiles (incluyendo el disolvente) son transferidos al cuerpo central encamisado, de donde pasan a un matraz más pequeño. Como este último matraz está sumergido en una trampa de nitrógeno, el destilado condensa. La otra trampa de nitrógeno con la que cuenta el equipo se utiliza como protección de la bomba de vacío.

### **Aplicación del DSE - HVT en el análisis del aroma de alimentos**

La extracción con disolventes, ya sea sobre matrices sólidas o líquidas, es una de las técnicas de obtención de extractos clásica, ampliamente utilizada desde los inicios de la Química. De ahí que su uso sobre alimentos para conseguir extractos aromáticos esté muy extendido, aunque últimamente esté perdiendo terreno frente a otro tipo de técnicas más rápidas, limpias y respetuosas con el medio ambiente.

Respecto al *High-Vacuum Transfer* (o a su versión más moderna del *Solvent Assisted Flavor Evaporation*), también son numerosas sus aplicaciones en el campo del análisis del aroma, ya que permite obtener extractos constituidos únicamente por volátiles, sin la interferencia de otros compuestos presentes en los alimentos.

De esta manera, estas dos metodologías, y más concretamente la DSE unida al HVT, se han utilizado en la obtención de extractos aromáticos de muy distintos productos alimenticios: queso Cheddar [65], leche en polvo desnatada [66], preparados aromatizantes de proteínas de soja [67], sardinas [68], pistachos [69], etc. Por su parte, la DSE unida al SAFE se ha aplicado sobre jamón [70], cacahuets [71] o huevas de erizo de mar [72], por ejemplo.

En cualquier caso, los resultados son satisfactorios y los extractos aromáticos obtenidos han podido ser utilizados posteriormente para caracterizar del aroma de esos productos [65, 67, 70, 71], determinar del efecto que algunos procesos térmicos tienen sobre los compuestos responsables del aroma [66] o comprobar la frescura de los alimentos [68].

Finalmente, comparando las dos técnicas de extracción de volátiles explicadas a lo largo de este capítulo de la tesis doctoral (SPME y DSE-HVT), se ha podido comprobar que ambas son adecuadas para el análisis de los compuestos responsables del aroma de los alimentos [69, 73]. Pero se ha visto que la SPME, además de ser más rápida, sencilla y barata, presenta límites de detección más bajos, con lo que es adecuada para la identificación de aquellos compuestos que se encuentran en concentraciones traza. Otra ventaja que presenta es que, gracias a que no se utilizan disolventes, no se produce la coelución de los mismos con los analitos de interés, con lo que estos no quedan enmascarados.

En cualquier caso, ambas técnicas son válidas para obtener extractos representativos del aroma del alimento que se quiera analizar, y su combinación con la cromatografía de gases-olfatometría (GCO) permite una completa caracterización de los compuestos aromáticos.

### **3.3.- LA GCO EN EL ANÁLISIS DEL AROMA DE LOS ALIMENTOS**

Tal como se ha ido exponiendo a lo largo de esta tesis doctoral, el aroma de los alimentos es una parte fundamental de los mismos, considerado un importante parámetro de calidad, ya que es responsable, en gran medida, de la aceptación o el rechazo de estos productos por parte de los consumidores. La mayoría de los alimentos presenta un aroma sumamente complejo, en el que intervienen un gran número de compuestos de distinta naturaleza química con muy diversas propiedades sensoriales. Además, esta complejidad aumenta por el efecto matriz del alimento en el que se encuentran los odorantes, y por el hecho de que, muchos de estos compuestos, aparezcan en concentraciones muy bajas. Por todo ello, y aunque a lo largo de los últimos años se han producido numerosos avances en las técnicas analíticas, el análisis del aroma de los alimentos continúa siendo un importante reto.

Las aplicaciones de la cromatografía de gases-olfatometría en el análisis del aroma de los alimentos son varias, aunque lo más habitual es su empleo en la caracterización del perfil aromático de las muestras. De este modo, se puede llegar a determinar la importancia relativa que presentan los compuestos aromáticamente activos en del aroma global de un alimento. Sin embargo, también hay que tener en cuenta otros usos de la GCO no menos importantes, como son la determinación de compuestos impacto y de *off-flavors*, su empleo en el control de calidad o para establecer una correlación entre datos sensoriales e instrumentales.

Debido a que este campo de investigación abarca varios ámbitos, los estudios relacionados con las aplicaciones de la GCO en el análisis del aroma de los alimentos son muy numerosos, sobre todo en lo que respecta a los últimos años. Por este motivo, a continuación sólo se presentan a grandes rasgos las distintas aplicaciones de esta técnica, haciéndose referencia a algunos de los trabajos existentes únicamente a modo de ejemplo, ya que no se pretende presentar una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el tema en esta tesis doctoral.

### **3.3.1.- Caracterización del aroma**

Gran parte de los trabajos en los que se emplea la GCO para analizar el aroma de los alimentos se centra en la identificación de aquellos odorantes responsables del aroma. En la mayoría de los casos, además, se persigue una jerarquización de los mismos. Así se puede llegar a saber qué compuestos son los más importantes, los que originan el aroma del producto. Por este motivo existen estudios sobre la caracterización del aroma de prácticamente todos los alimentos: desde bebidas alcohólicas, como el vino [74, 75] o la cachaza y el ron [76], hasta bebidas no alcohólicas, como el té [77], los zumos de frutas (78) o la leche desnatada en polvo [66], pasando por alimentos típicos de la dieta mediterránea, como el aceite de oliva virgen [79, 80], así como de aceites de otras materias primas (cacahuets, avellanas y semillas de calabaza) [81]. Entre los alimentos sólidos que se han estudiado, encontramos varios tipos de queso: cheddar británico [65], queso azul y otros quesos

curados (cheddar, parmesano, pecorino y *Grana Padano*) [82], al igual que jamón curado con sal [70], filetes de carne de vacuno [83], cangrejos al vapor [84] o huevas de erizo de mar [72]. Del mismo modo, se han caracterizado numerosos productos vegetales, como los espárragos cocidos [85], las trufas [86], distintas variedades de albaricoques [87], chocolate negro [88], etc. Incluso hasta preparados aromatizantes de proteínas de soja [67].

En algunos casos, estos estudios han ido encaminados únicamente a la identificación de los odorantes más potentes presentes en un determinado tipo de alimento [65, 70, 72, 74, 81, 84], pero en otros, el objetivo es caracterizar la tipicidad que proporciona una materia prima, variedad, especie o zona de producción [66, 75, 77-80, 82, 86, 87]. De este modo, en el caso de la carne de vacuno, el perfil aromático obtenido ha permitido identificar diferencias en el mismo originadas por la distinta alimentación de los animales (convencional u orgánica) [83], y en el caso de los espárragos cocidos, las diferencias detectadas presentan relación con el genotipo estudiado [85], al igual que los procesos tecnológicos seguidos en la elaboración también influyen en el aroma del producto final obtenido [88].

### **3.3.2.- Determinación de compuestos impacto**

El aroma de los distintos productos alimenticios depende, indudablemente, del tipo de producto del que se trate, de la materia prima empleada y del proceso de elaboración seguido, así como de la zona geográfica de producción. Todos estos factores son los que proporcionan la tipicidad, los que hacen que el aroma sea característico y distinto para cada alimento, aunque puedan coincidir varios de estos factores.

En muchos casos, esta tipicidad está directamente relacionada con la presencia de compuestos responsables, por sí solos, del olor propio e identificativo del producto, los denominados compuestos impacto o compuestos clave. Por este motivo, y sobre todo en aquellos alimentos que se consumen, no por su aporte nutricional, sino por el placer que proporciona su ingesta (donde sus características

organolépticas adquieren más protagonismo), existe un gran número de estudios en los que se caracteriza el aroma de los alimentos con el objetivo de determinar esos compuestos que les confieren su identidad sensorial. Uno de los productos más estudiados y analizados, y que mejor ejemplariza este hecho, es el vino, ya que se han realizado trabajos para identificar los compuestos impacto en vinos de una misma variedad [89], en vinos de distintas variedades [90] o en vinos procedentes de una misma zona de producción, tanto tintos [91] como blancos [92], e incluso se han estudiado los compuestos con carácter impacto de distintas variedades de uvas habitualmente empleadas en vinificación [93].

Estudios similares se han llevado a cabo sobre otros alimentos, como distintas variedades de repollos [94], copos de avena [95], varios tipos de lecitinas de soja [96], mantequilla derretida [97], salsas de pescado [98], etc. De hecho, gracias a estos estudios, se ha podido determinar de manera concluyente la identidad de algunos compuestos con carácter impacto en ciertos alimentos, atribuida hasta entonces erróneamente a otros odorantes. Es el caso del aceite obtenido a partir de la piel de las naranjas, cuyo olor se había relacionado tradicionalmente con el valencene. Sin embargo, gracias a investigaciones más recientes, se ha podido saber que en realidad es el dodecanal el compuesto clave del aroma de este producto [99].

Para realizar estos trabajos de manera fiable son indispensables los estudios de reconstitución y omisión, lo que dificulta y ralentiza la investigación. En estos ensayos, una vez caracterizado el aroma de la muestra y cuantificados los compuestos que participan en el mismo, se prepara una mezcla con todos estos componentes, en las concentraciones reales en las que aparecen en dicha muestra. En un primer paso se comprueba, mediante el análisis sensorial, que el olor de esta mezcla realmente coincide con el del producto inicial. A continuación, se van eliminando los distintos componentes de la mezcla para ver cuál es el efecto sensorial que cada uno de ellos ejerce sobre el aroma global. Sin embargo, en este tipo de pruebas no se contemplan de manera directa los efectos aditivos, sinérgicos y antagonicos que se dan en las

mezclas complejas, por lo que es muy difícil evaluar el efecto que la supresión de uno de los odorantes tiene sobre el aroma [100, 101].

### **3.3.3.- Determinación de *off-flavors***

De forma general, los *off-flavors* u olores anómalos son olores desagradables o extraños que aparecen en un alimento, y que no se asocian con el aroma que normalmente presenta ese producto. Su origen, tal como ya se vio en el capítulo 2 de esta tesis doctoral, es diverso: degradación natural del alimento, contaminación por agentes externos, interacción con el material de embalaje, etc. Incluso, a veces, se desconoce qué los origina. Pero, en cualquier caso, la presencia de *off-flavors* siempre implica la pérdida de compuestos impacto o la aparición de otros nuevos que alteran el aroma original del producto en cuestión.

Dada la gran importancia que estos olores anómalos tienen en el aroma, debido a su incidencia negativa sobre las características organolépticas de los alimentos, son numerosos los trabajos desarrollados con el objetivo de determinar los compuestos responsables de estas notas aromáticas indeseables. Además, cualquier alimento puede sufrir algún proceso que desencadene la formación de estos compuestos, por eso hay estudios realizados sobre todo tipo de productos: desde trabajos en los que se han analizado los compuestos aromáticos desagradables generados por la contaminación de los jamones ibéricos durante su curado [102], hasta los que analizan el origen de los olores a seta, tierra o moho en uvas afectadas por la podredumbre [103]. Asimismo, se ha identificado la geosmina como el contaminante responsable de las notas terrosas de algunos vinos [104]. Respecto al efecto de los distintos procesados de alimentos, se ha visto que en el caso de los zumos de frutas, la luz es uno de los factores que favorecen la aparición de estos *off-flavors* [105], al igual que el proceso de enlatado [106], ya que este último incrementa el número y la concentración de compuestos azufrados.

En algunos casos, sin embargo este tipo de compuestos no tienen su origen en una contaminación o un mal procesado de los alimentos, sino que los *off-flavors*

aparecen de forma natural. Por ese motivo también encontramos un último grupo de estudios que tienen como objetivo identificar los odorantes responsables de estos olores anómalos en, por ejemplo, cacahuetes [71], truchas [107] o el hígado de cerdo [108].

### **3.3.4.- Correlación entre la GCO y el análisis sensorial tradicional**

Una de las áreas de estudio más interesantes cuando se trabaja con el aroma de los alimentos es la que intenta correlacionar los datos obtenidos en la GCO con los resultados que proporcionan los análisis sensoriales descriptivos. La forma más sencilla de hacerlo consiste en relacionar directamente las distintas familias de olores percibidos en el puerto olfatométrico con los descriptores sensoriales utilizados por los analistas en las sesiones de análisis sensorial, metodología que se ha aplicado en muestras tan diferentes como los mejillones cocidos [109] o el cava [110].

Sin embargo, las muestras aromáticas suelen ser muy complejas, y no es fácil llevar a cabo estas correlaciones, por lo que, normalmente, es necesario recurrir a las técnicas quimiométricas. En algunos casos, la quimiometría aplicada es relativamente sencilla, como puede ser el método de regresión por mínimos cuadrados o el análisis de componentes principales [111-115], pero en otros, las herramientas quimiométricas son más complejas, como ocurre con el diseño de modelos de predicción [116] o el análisis de proclústeres generalizados [117]. En cualquier caso, gracias a estas técnicas se han podido relacionar, por ejemplo, las propiedades sensoriales de algunos vinos con el perfil aromático que proporciona una determinada variedad de uva [111], o la calidad aromática reconocida de ciertos vinos tintos españoles con la presencia de una serie de odorantes negativos y de otro grupo de odorantes frutales y dulces [112]. También se ha logrado relacionar la calidad de los champiñones con aquellos compuestos olorosos responsables de ciertos atributos sensoriales [113], mientras que en las percas se ha relacionado el tipo de cría que hayan tenido (salvaje o en piscifactorías) con las distintas notas aromáticas que presentan [114]. Incluso se ha podido establecer una relación entre la calidad



aromática de la carne y las diferentes dietas con las que los corderos han sido alimentados [115]. Todas estas aplicaciones son sólo unos pocos ejemplos de un gran campo de investigación, pero suficientes para proporcionar una idea de lo que puede llegar a conseguirse mediante el uso conjunto de estas técnicas.

### **3.3.5.- Control de calidad**

En la actualidad, todos los productos alimenticios son sometidos a estrictos controles de calidad con el objetivo de asegurar su salubridad y valor nutricional, así como el mantenimiento de sus propiedades organolépticas. Estos controles se suceden de forma continua, y no sólo desde que se reciben las materias primas y hasta el momento en que el alimento procesado llega al consumidor, sino también durante la obtención de las propias materias primas.

Dado que el aroma que presentan los alimentos es una de sus características organolépticas más importantes, íntimamente relacionada con la calidad, su análisis constituye uno de los puntos clave de todo el proceso de control de calidad, y la GCO es una de las técnicas más adecuadas para llevarlo a cabo. Por este motivo, dicha técnica se ha empleado, por ejemplo, en el análisis de distintas bebidas alcohólicas de origen agrícola con diferentes calidades organolépticas [118]. En este trabajo se ha podido comprobar que la mayor cantidad de información acerca de la calidad de los productos se obtiene a través del análisis de sus odorantes más intensos, y que el trisulfito de dimetilo y la geosmina son los dos indicadores más significativos de la baja calidad sensorial de estas bebidas. También se ha relacionado la frescura de las sardinas con algunos volátiles aromáticos potentes, de manera que, cambios en la concentración y la percepción de estos odorantes dan una idea bastante acertada de la calidad del producto que llega al consumidor [68]. Asimismo, una de las etapas a tener en cuenta en la industria alimentaria, dada su gran influencia sobre la calidad, es el periodo de almacenamiento de las materias primas y los alimentos. De ahí que existan numerosos estudios sobre los cambios producidos en el perfil aromático de, entre otros, el azafrán [119], las peras [120] o, incluso, la leche materna [121],

durante ese almacenamiento. Al igual que también son varios los trabajos que analizan el efecto que las condiciones de temperatura, embalaje, etc. provocan sobre el aroma de los productos durante este periodo [122, 123].

Por último, a continuación se adjunta un cuadro resumen (**Tabla 3.2**) con los trabajos referenciados a lo largo de este capítulo y que han sido publicados desde el año 2005. Como ya se ha comentado anteriormente, no constituyen en modo alguno una revisión bibliográfica en profundidad sobre la aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría en el análisis del aroma de los alimentos, aunque sí proporcionan una idea de la magnitud y posibilidades de este campo de estudio.

Alimento	Objetivo	Preparación de muestra	Año	Ref.
Aceite de naranja	Determinar el papel del valencene en el aroma	Inyección directa	2005	[99]
Aceite de oliva	Caracterizar el aroma de aceites de oliva vírgenes de distintas variedades	DH	2006	[80]
Albaricoques	Caracterizar el aroma de distintas variedades de albaricoques	HS-SPME	2006	[87]
Arroz	Desarrollar modelos de predicción para los descriptores sensoriales basados en los compuestos aromáticos	DH	2008	[116]
Azafrán	Analizar el perfil volátil y las características sensoriales durante el almacenamiento	USAE con éter dietílico	2010	[119]
Bebidas alcohólicas	Determinar qué compuestos son responsables del deterioro de la calidad sensorial	HS-SPME	2009	[118]
Cacahuetes	Caracterizar los <i>off-flavors</i> responsables del olor a frutas fermentadas	DSE-SAFE	2008	[71]
Cachaza y ron	Caracterizar el aroma de ambos productos para comparar las potencias de sus odorantes	USAE con Freon-113	2006	[76]
Cangrejos de manglar al vapor	Identificar los odorantes responsables del aroma	SDE	2010	[84]
Carne de cordero asada	Relacionar el aroma de la carne con la dieta seguida por los animales	DH	2010	[115]
Cavas	Relacionar los perfiles sensorial, volátil y aromático	HS-SPME / LLE	2010	[110]
Champiñones	Relacionar los datos sensoriales e instrumentales en productos de distintas calidades	DSE-HVT	2007	[113]

Copos de avena	Caracterización del (E,E,Z)-2,4,6-nonatrienal como compuesto impacto	DSE-SAFE	2005	[95]
Huevas de erizo de mar	Identificar los odorantes responsables del aroma y de las diferencias sensoriales debidas al género y la zona de producción	DSE-SAFE	2010	[72]
Jamón americano	Determinar los compuestos aromáticamente activos	DSE-SAFE y DH	2008	[70]
Jamón ibérico	Caracterizar los odorantes presentes en jamones ibéricos contaminados durante su curado	DH	2010	[102]
Leche materna	Determinar los cambios sensoriales en el perfil aromático durante el almacenamiento a -19 °C	LLE-SAFE	2010	[121]
Mantequilla	Determinar los efectos del frío y del tipo de embalaje sobre los compuestos aromáticos durante el almacenamiento	DH	2007	[123]
Peras	Estudiar los cambios en la composición volátil durante el almacenamiento	HS-SPME	2006	[120]
Percas	Relacionar las características sensoriales y volátiles de muestras con cría salvaje y en cautividad	DH	2009	[114]
Pistachos	Comparar técnicas de obtención de extractos aromáticos representativos	HS-SPME y DSE-HVT	2010	[69]
Repollos	Determinar los compuestos impacto	SDE	2009	[94]
Salsa de pescado	Determinar los compuestos impacto	HS-SPME	2008	[98]
Snacks de patata	Comparar técnicas de obtención de extractos aromáticos representativos	HS-SPME, SAFE y SDE	2009	[73]
Truchas	Identificar los odorantes y los <i>off-flavors</i> de extractos aromáticos	MAD-SE	2009	[107]
Trufas	Caracterizar el aroma	DH	2010	[86]
Uvas (con podredumbre)	Caracterizar los <i>off-flavors</i> provocados por la podredumbre	DSE / LLE	2006	[103]
Uvas (variedad <i>Vitis vinifera</i> )	Identificar y cuantificar los compuestos impacto	DSE-SAFE	2010	[93]
Vino	Predecir las propiedades sensoriales del vino a partir de los datos de la GCO	DH	2005	[111]
Vinos Chardonnay	Determinar los compuestos impacto	LLE	2006	[89]
Vinos tintos de calidad	Determinar los compuestos aromáticamente activos e identificar qué interacciones entre odorantes son responsables de los matices afrutados	DH	2007	[75]
Vinos tintos españoles	Modelar la calidad del vino en función de los grupos de odorantes	DH	2009	[112]

Zumo de naranja exprimido a mano	Comparar los compuestos aromáticamente activos en zumos de distintas variedades de naranjas	HS-SPME	2006	[78]
Zumo de manzana turbio	Identificar los <i>off-flavors</i> inducidos por la luz	HS-SPME	2007	[105]
Zumo de naranja	Identificar los <i>off-flavors</i> que aparecen en zumos enlatados	Headspace estático	2007	[106]

DH: *Dynamic Headspace*

DSE: *Direct Solvent Extraction*

LLE: *Liquid-Liquid Extraction*

USAE: *Ultrasound Assisted Extraction*

HS-SPME: *Headspace - Solid Phase Microextraction*

MAD-SE: *Microwave assisted distillation-solvent extraction*

SAFE: *Solvent Assisted Flavor Evaporation*

SDE: *Simultaneous Distillation and Extraction*

**Tabla 3.2.** Ejemplos de aplicaciones de la GCO en el análisis del aroma de los alimentos realizadas desde 2005

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Maarse, H., editor. *Volatile compounds in foods and beverages*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1991.
- [2] Baines, D., Knights, K. Applications I: Flavors. En: Rowe, D. J., editor. *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2005, p. 274-304.
- [3] Grosch, W. Determination of potent odourants in foods by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) and calculation of Odour Activity Values (OAVs). *Flavour Fragr. J.* 1994; 9: 147-158.
- [4] Mayol, A. R., Acree, T. E. Advances in gas chromatography-olfactometry. En: Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T. E., editors. *Gas chromatography-olfactometry. The state of the art*. Washington: American Chemical Society; 2001, p. 1-10.
- [5] Blank, I. Gas chromatography-olfactometry in food aroma analysis. En: Marsili, R., editor. *Techniques for analyzing food aroma*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1997, p. 293-329.
- [6] James, A. T., Martin, J. P. Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *Analyst* 1952; 77: 915-932.
- [7] Fuller, G. H., Steltenkamp, R., Tisserand, G. A. The gas chromatography with human sensor: perfumer model. *Annals N. Y. Acad. Sci.* 1964; 116: 711-724.
- [8] Dravnieks, A., O'Donnell, A. Principles and some techniques of high-resolution headspace analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1971; 19: 1049-1056.
- [9] van Ruth, S. M. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomol. Eng.* 2001; 17: 121-128.
- [10] Delahunty, C. M., Eyres, G., Dufour, J.-P. Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci.* 2006; 29: 2107-2125.
- [11] Plutowska, B., Wardencki, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages – A review. *Food Chem.* 2008; 107: 449-463.
- [12] Patton, S., Josephson, D. V. A method for determining significance of volatile compounds in foods. *Food Res.* 1957; 22: 316-318.
- [13] Rothe, M., Thomas, B. Aromastoffe des Brotes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1963; 119: 302-310.

- [14] Acree, T., Barnard, J., Cunningham, D. A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chem.* 1984; 14: 273-286.
- [15] Ullrich, F., Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1987; 184: 277-282.
- [16] Schieberle, P., Grosch, W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1987; 185: 111-113.
- [17] Kerscher, R., Grosch, W. Comparative evaluation of potent odorants of boiled beef by aroma extract dilution and concentration analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* A 1997; 204: 3-6.
- [18] Linssen, J. P. H., Janssens, J. L. G. M., Roozen, J. P., Posthumus, M. A. Combined gas chromatography and sniffing port analysis of volatile compounds of mineral water packed in polyethylene laminated packages. *Food Chem.* 1993; 46: 367-371.
- [19] Pollien, P., Ott, A., Montigon, F., Baumgartner, M., Muñoz-Box, R., Chaintreau, A. Hyphenated headspace-gas chromatography-sniffing technique: screening of impact odorants and quantitative aromagram comparisons. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 2630-2637.
- [20] McDaniel, M. R., Miranda-Lopez, R., Watson, B. T., Micheals, N. J. Libbey, L. M. Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. En: Charalambous, G., editor. *Flavors and off-flavors.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1990, vol. 24, p. 23-36.
- [21] da Silva, M. A. A. P., Lundahl, D. S., McDaniel, M. R. The capability and psychophysics of Osme: a new GC-olfactometry technique. En: Maarse, H., van der Heij, D. G., editors. *Trends in flavour research.* Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1994, vol. 35, p. 191-209.
- [22] Guichard, H., Guichard, E., Langlois, D., Issanchou, S., Abbott, N. GC sniffing analysis: olfactive intensity measurement by two methods. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1995; 201: 344-350.
- [23] Etiévant, P. X., Callement, G., Langlois, D., Issanchou, S., Coquibus, N. Odor intensity evaluation in gas chromatography-olfactometry by finger span method. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 1673-1680.
- [24] d'Acampora Zellner, B., Dugo, P., Dugo, G., Mondello, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A* 2008; 1186: 123-143.

- [25] Le Guen, S., Prost, C., Demaimay, M. Critical comparison of three olfactometric methods for the identification of the most potent odorants in cooked mussels (*Mytilus edulis*). *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 1307-1314.
- [26] van Ruth, S. M. Evaluation of two gas chromatography-olfactometry methods: the detection frequency and perceived intensity method. *J. Chromatogr. A* 2004; 1054: 33-37.
- [27] van Ruth, S. M., O'Connor, C. H. Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods: comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatile compounds with sensory headspace data. *Food Chem.* 2001; 74: 341-347.
- [28] Chaintreau, A. Quantitative use of gas chromatography-olfactometry: the GC-"SNIF" method. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002, p. 333-348.
- [29] Pollien, P., Fay, L. B., Baumgartner, M., Chaintreau, A. First attempt of odorant quantification using gas chromatography-olfactometry. *Anal. Chem.* 1999; 71: 5391-5397.
- [30] Ferreira, V., Pet'ka, J., Aznar, M., Cacho, J. Quantitative gas chromatography-olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector. *J. Chromatogr. A* 2003; 1002: 169-178.
- [31] Mistry, B. S., Reineccius, T., Olson, L. K. Gas Chromatography-olfactometry for the determination of key odorants in foods. En: Marsili, R., editor. *Techniques for analyzing food aroma*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1997, p. 265-292.
- [32] Reineccius, G. Choosing the correct analytical technique in aroma analysis. En: Voilley, E., Etiévant, P., editors. *Flavour in food*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2006, p. 81-97.
- [33] Arthur, C. L., Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 1990; 62: 2145-2148.
- [34] Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York: Wiley-VCH, Inc.; 1997.
- [35] Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* 2000; 880: 35-62.
- [36] Zhang, Z., Yang, M. J., Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 1994; 66: 844 A-853 A.

- [37] Zhang, Z., Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 1993; 65: 1843-1852.
- [38] Mullet, W. M., Pawliszyn, J. The development of selective and biocompatible coatings for solid phase microextraction. *J. Sep. Sci.* 2003; 26: 251-260.
- [39] Augusto, F., Carasek, E., Gomes Costa Silva, R., Rivellino, S. R., Domingues Batista, A., Martendal, E. New sorbents for extraction and microextraction techniques. *J. Chromatogr. A* 2010; 1217: 2533-2542.
- [40] Zhang, Z., Pawliszyn, J. Quantitative extraction using an internally cooled solid phase microextraction device. *Anal. Chem.* 1995; 67: 34-43.
- [41] Risticvic, S., Niri, V. H., Vuckovic, D., Pawliszyn, J. Recent developments in solid-phase microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009; 393: 781-795.
- [42] Prosen, H., Zupančič-Kralj, L. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* 1999; 18: 272-282.
- [43] Louch, D., Motlagh, S., Pawliszyn, J. Dynamics of organic compounds extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem.* 1992; 64: 1187-1199.
- [44] Harmon, A. D. Solid-phase microextraction for the analysis of flavors. En: Marsili, R., editor. *Techniques for analyzing food aroma*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1997, p. 81-112.
- [45] Plutowska, B., Wardencki, W. Aromagrams – Aromatic profiles in the appreciation of food quality. *Food Chem.* 2007; 101: 845-872.
- [46] Wardencki, W., Michulec, M., Curylo, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2004; 39: 703-717.
- [47] Wilkes, J. G., Conte, E. D., Kim, Y., Holcomb, M., Sutherland, J. B., Miller, D. W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. *J. Chromatogr. A* 2000; 880: 3-33.
- [48] Mestres, M., Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J. Simultaneous analysis of thiols, sulphides and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1999; 849: 293-297.
- [49] Sala, C., Mestres, M., Martí, M. P., Busto, O., Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A* 2000; 880: 93-99.



- [50] Riu, M., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatogr. A* 2002; 977: 1-8.
- [51] Mateo-Vivaracho, L., Ferreira, V., Cacho, J. Automated analysis of 2-methyl-3-furanthiol and 3-mercaptohexyl acetate at  $\text{ng L}^{-1}$  level by headspace solip-phase microextraction with on-fibre derivatisation and gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometric determination. *J. Chromatogr. A* 2006; 1121: 1-9.
- [52] Vesely, P., Lusk, L., Basarova, G., Seabrooks, J., Ryder, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fibre derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 6941-6944.
- [53] Saison, D., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Delvaux, F. R. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2009; 1216: 5061-5068.
- [54] Reineccius, G. A. Flavour-isolation techniques. En: Berger, R. G., editor. *Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin: Springer; 2007, p. 409-426.
- [55] Da Costa, N. C., Eri, S. Identification of aroma chemicals. En: Rowe, D. J., editor. *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005, p. 12-34.
- [56] Parliment, T. Solvent extraction and distillation techniques. En: Marsili, R., editor. *Flavor, fragrance, and odor analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002, p. 1-23.
- [57] Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Food Chemistry*. 3<sup>rd</sup> revised edition. Berlin: Springer; 2004.
- [58] Grosch, W. Aroma compounds. En: Nollet, L. M. L., editor. *Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis*. 2<sup>nd</sup> edition, revised and expanded. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2004, p. 717-746.
- [59] Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P. Solvent assisted flavour evaporation – a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices. *Eur. Food Res. Technol.* 1999; 209: 237-241.
- [60] Weurman, C., Groenen, P. J., van Gemert, L. J. Experiments on “High-Vacuum Transfer” in food odour research. *Nahrung* 1970; 14: 607-616.

- [61] Schieberle, P., Grosch, W. Photolyse von 13(S)-Hydroperoxy-9(Z), 11(E)-octadecadiensäuremethylester in Gegenwart von Sauerstoff – Analyse der niedermolekularen Reaktionsprodukte. *Fette Seifen Anstrichm.* 1985; 87: 76-80.
- [62] Guth, H., Grosch, W. 3-methylnonane-2,4-dione – An intense odour compound formed during flavour reversion of soyabean oil. *Fat Sci. Technol.* 1989; 91: 225-230.
- [63] Sen, A., Laskawy, G., Schieberle, P., Grosch, W. Quantitative determination of  $\beta$ -damascenone in foods using a stable isotope dilution assay. *J. Agric. Food Chem.* 1991; 39: 757-759.
- [64] Jung, H. P., Sen, A., Grosch, W. Evaluation of potent odorants in parsley leaves (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ssp. *crispum*) by aroma extract dilution analysis. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1992; 25: 55-60.
- [65] Suriyaphan, O., Drake, M. A., Chen, X. Q., Cadwallader, K. R. Characteristic aroma components of British Farmhouse Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 1382-1387.
- [66] Karagül-Yüceer, Y., Drake, M. A., Cadwallader, K. R. Aroma-active components of nonfat dry milk. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2948-2953.
- [67] Wu, Y.-F. G., Cadwallader, K. R. Characterization of the aroma of a meatlike process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 2900-2907.
- [68] Triqui, R., Bouchriti, N. Freshness assessments of Moroccan sardine (*Sardina pilchardus*): comparison of overall sensory changes to instrumentally determined volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7540-7546.
- [69] Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., Mestres, M. Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachio aroma. *J. Chromatogr. A* 2010; 1217: 7781-7787.
- [70] Song, H., Cadwallader, K. R. Aroma components of American country ham. *J. Food Sci.* 2008; 73: 29-35.
- [71] Greene, J. L., Sanders, T. H., Drake, M. A. Characterization of volatile compounds contributing to naturally occurring fruity fermented flavor in peanuts. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 8096-8102.
- [72] Niimi, J., Leus, M., Silcock, P., Hamid, N., Bremer, P. Characterisation of odour active volatile compounds of New Zealand sea urchin (*Evechinus chloroticus*) roe using gas

- chromatography-olfactometry-finger span cross modality (GC-O-FSCM) method. *Food Chem.* 2010; 121: 601-607.
- [73] Majcher, M., Jelén, H. H. Comparison of suitability of SPME, SAFE and SDE methods for isolation of flavor compounds from extruded potato snacks. *J. Food Compos. Anal.* 2009; 22: 606-612.
- [74] Martí, M. P., Mestres, M., Sala, C., Busto, O., Guasch, J. Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 7861-7865.
- [75] Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 4501-4510.
- [76] de Souza, M. D. C. A., Vásquez, P., del Mastro, N. L., Acree, T. E., Lavin, E. H. Characterization of cachaça and rum aroma. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 485-488.
- [77] Kumazawa, K., Masuda, H. Identification of potent odorants in different green tea varieties using flavor dilution technique. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5660-5663.
- [78] Arena, E., Guarrera, N., Campisi, S., Nicolosi Asmundo, C. Comparison of odour active compounds detected by gas-chromatography-olfactometry between hand-squeezed juices from different orange varieties. *Food Chem.* 2006; 98: 59-63.
- [79] Reiners, J., Grosch, W. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 2754-2763.
- [80] Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chem.* 2006; 98: 243-252.
- [81] Matsui, T., Guth, H., Grosch, W. A comparative study of potent odorants in peanut, hazelnut, and pumpkin seed oils on the basis of aroma extract dilution analysis (AEDA) and gas chromatography-olfactometry of headspace samples (GCOH). *Fett/Lipid* 1998; 100: 51-56.
- [82] Frank, D. C., Owen, C. M., Patterson, J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2004; 37: 139-154.
- [83] Machiels, D., van Ruth, S. M., Posthumus, M. A., Istasse, L. Gas chromatography-olfactometry analysis of the volatile compounds of two commercial Irish beef meats. *Talanta* 2003; 60: 755-764.

- [84] Yu, H.-Z., Chen, S.-S. Identification of characteristic aroma-active compounds in steamed mangrove crab (*Scylla serrata*). *Food Res. Int.* 2010; 43: 2081-2086.
- [85] Ulrich, D., Hoberg, E., Bittner, T., Engewald, W., Meilchen, K. Contribution of volatile compounds to the flavor of cooked asparagus. *Eur. Food Res. Technol.* 2001; 213: 200-204.
- [86] Culleré, L., Ferreira, V., Chevret, B., Venturini, M. E., Sánchez-Gimeno, A. C., Blanco, D. Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.* 2010; 122: 300-306.
- [87] Guillot, S., Peytavi, L., Bureau, S., Boulanger, R., Lepoutre, J.-P., Crouzet, J., Schorr-Galindo, S. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.* 2006; 96: 147-155.
- [88] Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., Collin, S. Use of gas chromatography-olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 2385-2391.
- [89] Lorrain, B., Ballester, J., Thomas-Danguin, T., Blanquet, J., Meunier, J. M., Le Fur, Y. Selection of potential impact odorants and sensory validation of their importance in typical Chardonnay wines. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 3973-3981.
- [90] Guth, H. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 3022-3026.
- [91] Aznar, M., López, R., Cacho, J. F., Ferreira, V. Identification and quantification of aged red wines from Rioja. GC-Olfactometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fraction. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2924-2929.
- [92] López, R., Ortín, N., Pérez-Trujillo, J. P., Cacho, J., Ferreira, V. Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3419-3425.
- [93] Fan, W., Xu, Y., Jiang, W., Li, J. Identification and quantification of impact aroma compounds in 4 nonfloral *Vitis vinifera* varieties grapes. *J. Food Sci.* 2010; 75: 81-88.
- [94] Breme, K., Langle, S., Fernandez, X., Meierhenrich, U. J., Brevard, H., Joulain, D. Character impact odorants from *Brassicaceae* by aroma extract dilution analysis (AEDA): *Brassica cretica* and *Brassica insularis*. *Flavour Fragr. J.* 2009; 24: 88-93.

- [95] Schuh, C., Schieberle, P. Characterization of (*E,E,Z*)-2,4,6-nonatrienal as a character impact aroma compound of oat flakes. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 8699-8705.
- [96] Stephan, A., Steinhart, H. Identification of character impact odorants of different soybean lecithins. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 2854-2859.
- [97] Peterson, D. G., Reineccius, G. A. Determination of the aroma impact compounds in heated sweet cream butter. *Flavour Fragr. J.* 2003; 18: 320-324.
- [98] Pham, A. J., Schilling, M. W., Yoon, Y., Kamadia, V. V., Marshall, D. L. Characterization of fish sauce aroma-impact compounds using GC-MS, SPME-Osme-GCO, and Stevens' power law exponents. *J. Food Sci.* 2008; 73: 268-274.
- [99] Elston, A., Lin, J., Rouseff, R. Determination of the role of valencene in orange oil as a direct contributor to aroma quality. *Flavour Fragr. J.* 2005; 20: 381-386.
- [100] Grosch, W. Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chem. Senses* 2001; 26: 533-545.
- [101] Jarauta, I., Ferreira, V., Cacho, J. F. Synergic, additive and antagonistic effects between odorants with similar odour properties. *Develop. Food Sci.* 2006; 43: 205-208.
- [102] Carrapiso, A. I., Martín, L., Jurado, Á., García, C. Characterisation of the most odour-active compounds of bone tainted dry-cured Iberian ham. *Meat Sci.* 2010; 85: 54-58.
- [103] La Guerche, S., Dauphin, B., Pons, M., Blancard, D., Darriet, P. Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 9193-9200.
- [104] Darriet, P., Pons, M., Lamy, S., Dubourdieu, D. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 4835-4838.
- [105] Hashizume, M., Gordon, M. H., Mottram, D. S. Light-induced off-flavor development in cloudy apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 9177-9182.
- [106] Ruiz Perez-Cacho, P., Mahattanatawee, K., Smoot, J. M., Rouseff, R. Identification of sulfur volatiles in canned orange juices lacking orange flavor. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 5761-5767.
- [107] Selli, S., Prost, C., Serot, T. Odour-active and off-odour components in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) extracts obtained by microwave assisted distillation-solvent extraction. *Food Chem.* 2009; 114: 317-322.
- [108] Im, S., Kurata, T. Characterization of off-flavors in porcine liver collected by SDE. *Food Sci. Technol. Res.* 2003; 9: 338-341.

- [109] Le Guen, S., Prost, C., Demaimay, M. Evaluation of the representativeness of the odor of cooked mussel extracts and the relationship between sensory descriptors and potent odorants. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 1321-1327.
- [110] Torrens, J., Riu-Aumatell, M., Vichi, S., López-Tamames, E., Buxaderas, S. Assessment of volatile and sensory profiles between base and sparkling wines. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 2455-2461.
- [111] Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 5682-5690.
- [112] Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Saenz-Navajas, M. P., Cacho, J. Modeling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 7490-7498.
- [113] Cho, I. H., Lee, S. M., Kim, S. Y., Choi, H.-K., Kim, K.-O., Kim, Y.-S. Differentiation of aroma characteristics of pine-mushrooms (*Tricholoma matustake* Sing.) of different grades using gas chromatography-olfactometry and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 2323-2328.
- [114] Frank, D., Poole, S., Kirchoff, S., Forde, C. Investigation of sensory and volatile characteristics of farmed and wild barramundi (*Lates calcarifer*) using gas chromatography-olfactometry mass spectrometry and descriptive sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 10302-10312.
- [115] Resconi, V. C., Campo, M. M., Montossi, F., Ferreira, V., Sañudo, C., Escudero, A. Relationship between odour-active compounds and flavour perception in meat from lambs fed different diets. *Meat Sci.* 2010; 85: 700-706.
- [116] Limpawattana, M., Yang, D. S., Kays, S. J., Shewfelt, R. L. Relating sensory descriptors to volatile components in flavor of specialty rice types. *J. Food Sci.* 2008; 73: 456-461.
- [117] Le Fur, Y., Mercurio, V., Moio, L., Blanquet, J., Meunier, J. M. A new approach to examine the relationships between sensory and gas chromatography-olfactometry data using generalized procrustes analysis applied to six French Chardonnay wines. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 443-452.
- [118] Plutowska, B., Wardencki, W. Headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry analysis of raw spirits of different organoleptic quality. *Flavour Fragr. J.* 2009; 24: 177-185.

- [119] Maggi, L., Carmona, M., Zalacain, A., Kanakis, C. D., Anastasaki, E., Tarantilis, P. A., Polissiou M. G., Alonso, G. L. Changes in saffron volatile profile according to its storage time. *Food Res. Int.* 2010; 43: 1329-1334.
- [120] Chen, J. L., Wu, J. H., Wang, Q., Deng, H., Hu, X. S. Changes in the volatile compounds and chemical and physical properties of Kuerle fragrant pear (*Pyrus serotina* Reld) during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 8842-8847.
- [121] Spitzer, J., Buettner, A. Characterization of aroma changes in human milk during storage at -19 °C. *Food Chem.* 2010; 120: 240-246.
- [122] Jacobsson, A., Nielsen, T., Sjöholm, I. Influence of temperature, modified atmosphere packaging, and heat treatment on aroma compounds in broccoli. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 1607-1614.
- [123] Lozano, P. R., Miracle, E. R., Krause, A. J., Drake, M., Cadwallader, K. R. Effect of cold storage and packaging material on the major aroma components of sweet cream butter. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 7840-7846.

*La cromatografía de gases con detector olfatimétrico: una herramienta  
esencial para el análisis del aroma de bebidas alcohólicas*

**Cerveza y Malta 2009, XLVI (2), 182, 49-62**



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## **La Cromatografía de Gases con Detector Olfatimétrico: Una herramienta esencial para el Análisis del Aroma de Bebidas Alcohólicas**

Laura Aceña, Olga Busto, Montserrat Mestres, Josep Guasch

Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments.

Departament de Química Analítica i Química Orgànica.

Campus Sescelades. Facultat d'Enologia.

Universitat Rovira i Virgili. 43007-Tarragona

### **Resumen**

Aunque las primeras aplicaciones de la cromatografía de gases con detector olfatimétrico (GCO) al análisis del aroma se llevaron a cabo hace casi 50 años, ha sido en la última década cuando se han intensificado los estudios sobre la actividad aromática y la contribución de los distintos componentes al aroma de diversas bebidas alcohólicas utilizando esta técnica. El hecho de añadir a un cromatógrafo de gases un puerto olfatimétrico es lo que permite que con la GCO se consiga la separación de los constituyentes de un extracto aromático y que estos puedan ser evaluados sensorialmente a su salida de la columna cromatográfica. De esta manera, con el detector olfatimétrico es posible hacer una valoración tanto cualitativa como cuantitativa de los distintos componentes aromáticos del extracto que se quiera analizar y, con el detector instrumental, se puede, además, identificarlos y cuantificarlos.

En este artículo se describen las distintas técnicas olfatimétricas desarrolladas para obtener una estimación de la importancia sensorial de los diferentes compuestos en el aroma global de una muestra, y se comentan sus ventajas e inconvenientes. Se presenta también una revisión general sobre las aplicaciones de la técnica en el campo de las bebidas alcohólicas, ya sea para la caracterización aromática, la determinación de compuestos concretos o para el control de calidad.

**Palabras clave:** aroma, compuestos volátiles, bebidas alcohólicas, análisis sensorial, cromatografía de gases-olfatimetría

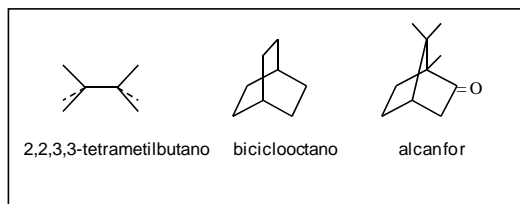
### **Abstract**

Although the gas chromatography-olfactometry (GCO) has already been applied for over 40 years to the aroma analysis, it has not been until last decade when the researchers have intensified their studies regarding the aromatic activity and the contribution of the different components to the aroma of various alcoholic beverages. Qualitative and quantitative odour evaluation of the different components of a sample is possible thanks to the presence of a special attachment to gas chromatograph so-called olfactometric port. This port is connected in parallel to conventional detectors in such a way that the analytes reach both detectors simultaneously. Therefore, with the instrumental detectors it is possible the identification and also the quantification of the different aromatic compounds detected on the olfactometric port.

**Keywords:** aroma, volatile compounds, alcoholic beverages, sensory analysis, gas chromatography-olfactometry

## 1.- Introducción

En el campo de la alimentación y también en el de las bebidas alcohólicas, el aroma es una de las propiedades sensoriales decisivas para la selección y aceptación de muchos productos. Para que esta percepción sensorial tenga lugar es necesario que las sustancias responsables del aroma lleguen a las fosas nasales del consumidor. Ahí es donde interaccionarán con receptores proteínicos de las membranas celulares de manera que, tras una cadena de reacciones químicas, se obtendrá información sobre la calidad y cantidad del aroma percibido. Así pues, los componentes del aroma de un alimento o bebida tienen que ser volátiles para que lleguen hasta la nariz, ya sea por vía nasal directa -cuando lo acercamos a la nariz- o por vía retronasal -en el momento de ser ingeridos-. Sin embargo, teniendo en cuenta que existen muchas sustancias volátiles inodoras, resulta evidente que la volatilidad es una condición necesaria pero no suficiente para que una sustancia huelga, por lo que habrá que tener en cuenta otros factores tales como la estructura de la molécula, la concentración y entorno en que ésta se encuentra y la sensibilidad del consumidor [1-3].



**Figura 1.** Estructuras de olor similar

En un compuesto aromático, la relación estructura-olor viene determinada por la presencia de un grupo osmóforo y la geometría de la molécula. Es decir, es necesario un grupo químico capaz de impresionar nuestros sentidos y una disposición adecuada de los átomos de la molécula para que el compuesto aromático incida en un sitio concreto de nuestra pituitaria, de manera que pueda percibirse uno u otro olor. Cada uno de estos parámetros tiene un peso específico más o menos importante dependiendo de la sustancia odorante. Así por ejemplo, el 2,2,3,3-tetrametilbutano y el biciclooctano poseen un olor muy parecido al del alcanfor, lo cual sugiere que lo que tiene una importancia decisiva en este aroma no son los grupos funcionales, sino la forma compacta y casi esférica de la molécula (**Figura 1**). En cambio, compuestos como el amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) o el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) presentan un olor extremadamente intenso, que no puede explicarse a partir de consideraciones de tipo estérico. El que domina en este caso es el grupo funcional [2].

Otro factor a tener en cuenta es que es necesario un número mínimo de moléculas -o una determinada concentración de una sustancia- para que el sentido del olfato sea capaz de percibirla

o, dicho de otro modo, para llegar a lo que se denomina el umbral de percepción. Determinar el valor de este parámetro no siempre es tarea fácil puesto que cada individuo presenta una sensibilidad olfativa propia y, además, un mismo olor puede percibirse de manera muy distinta dependiendo del entorno en el que se encuentre. De hecho, en nuestra vida cotidiana, muy raramente encontramos olores simples ya que casi todos ellos son, en realidad, mezclas complejas de distintas sustancias odoríferas. Sin embargo, hay que decir también que nuestro sentido del olfato es limitado a la hora de identificar olores por lo que, incluso en las mezclas más simples -si no estamos debidamente entrenados o no tenemos un don innato- no solemos percibir aromas distintos sino que lo identificamos como una unidad [3]. Esto se debe a que, con la evolución, el hombre ha ido perdiendo la necesidad primaria del olfato para su subsistencia, lo cual ha ido en detrimento de este sentido. Además, tal y como se detalla más adelante, estas muestras complejas tienen efectos adicionales sobre los aromas individuales de manera que un aroma complejo no puede considerarse como la suma aritmética de los aromas que lo componen. Las interacciones entre los distintos componentes pueden dar lugar a intensificación de una nota aromática o a su atenuación dependiendo de las concentraciones a las que se encuentren, de la matriz que los contenga y de las condiciones ambientales en las que se perciba ese aroma.

Así pues, de manera consciente algunas veces e inconsciente la mayoría de ellas, la llegada de un odorante al olfato nos lleva a hacer una valoración cualitativa, cuantitativa e incluso afectiva de la sensación aromática percibida [1-3]. Estos tres parámetros, conocidos también como las tres dimensiones de la sensibilidad aromática, son los que determinarán la calificación de cualquier sustancia tal y como se explica a continuación.

### **1.1. Sensibilidad Aromática**

Resulta curioso que cuando al querer describir algún olor no tengamos unos descriptores definidos y concretos como sí ocurre en el caso de los demás sentidos. Así pues, para poder valorar la vertiente cualitativa de la sensibilidad aromática, se suelen utilizar descriptores más o menos amplios y más o menos diferenciados (floral, especiado, afrutado, etc.), los cuales suelen ir acompañados de uno o más matices en función de la sensibilidad aromática de la persona que percibe el olor y también de la complejidad del aroma. De hecho, aunque existe algún compendio sobre el léxico del aroma [4], en general, sólo en campos muy concretos, donde el aroma es una variable muy importante, se han conseguido terminologías adecuadas y específicas. Éste es el caso del vino o la cerveza para los que a finales de los setenta-principios de los ochenta, se propuso una terminología estandarizada de sus

respectivos aromas que, debido a su representación gráfica, se conoce como “la rueda de los aromas” del vino [5] o de la cerveza [6].

Por otro lado, cabe destacar que, independientemente de que podamos definirlo, cuando percibimos un olor nuestra memoria reactiva recuerdos, provoca emociones e, incluso, impulsa acciones. Así, por ejemplo, reaccionamos ante olores repulsivos o fétidos, que pueden llegar a provocarnos náuseas, debido a que estos actúan como medio de defensa o de repulsión ante cosas que pueden ser peligrosas para nosotros -aunque la costumbre ha ido disminuyendo el uso de estas advertencias-. Contrariamente, existe toda una serie de olores que nos resultan extremadamente agradables y que, muchas veces, nos trasladan en el tiempo a momentos especiales de nuestra vida. Estas respuestas se dan porque en la percepción olfativa, aparte de la etapa química donde los receptores envían señales hacia nuestro cerebro, hay otra psíquica en la que nuestra memoria, activada por el reconocimiento del olor en el cerebro, recuerda todo el contexto emocional en el que se percibió aquella sensación. Toda esta parte de la percepción aromática que está relacionada con la psicología de cada individuo es lo que constituye la vertiente afectiva de la sensibilidad aromática y es la que explica que cada persona aprecie de manera diferente un mismo olor [2, 3].

Respecto a la medida de la dimensión cuantitativa del aroma, al igual que la medida de las otras dimensiones de la sensibilidad aromática, resulta un tanto subjetiva puesto que sólo los métodos fisiológicos que utilizan el aparato olfativo humano pueden darnos una medida de ésta. Estos métodos tienen en cuenta que este órgano envía estímulos al cerebro para valorar y cuantificar las sensaciones percibidas a partir de la cantidad de sustancia que le llega. Sin embargo, con el fin de minimizar la subjetividad que implica esta valoración sensorial, se han definido dos parámetros que, en este contexto, resultan de gran importancia. Son los denominados “umbrales de percepción” y “valores de aroma” [1].

El umbral de percepción, tal y como se ha comentado anteriormente, hace referencia a aquella cantidad de compuesto oloroso que resulta suficiente para reconocerlo por su olor y que dependerá, en gran medida, de la complejidad de la matriz y del entorno en que se encuentre el compuesto odorante. A título de ejemplo, la **Tabla 1** proporciona las concentraciones de los umbrales olfativos de algunos compuestos en distintas matrices [7-9]. Los distintos valores muestran cómo influye la matriz en la actividad aromática de los odorantes. De este modo, mientras que para percibir el olor a rosas del 2-feniletanol disuelto en agua es necesaria una concentración de 1 ppm, para percibirlo en el aire se necesita una concentración casi un millón de veces más pequeña. Con esto resulta obvio que para determinar la importancia sensorial de un compuesto individual en el

aroma total de un producto, no nos vale con saber sólo su concentración sino que también nos es necesaria la información referente a su umbral de percepción.

Compuesto	Descriptor	Umbral olfativo (mg/L)		
		Aire	Agua	Otras Matrices
Ácido acético	<i>vinagre</i>	$60 \cdot 10^{-6}$	22-50	175 (1)
2,3-butadiona	<i>mantequilla</i>	$15 \cdot 10^{-6}$	$10 \cdot 10^{-3}$	$66 \cdot 10^{-3}$ (1)
Acetaldehído	<i>picante, rancio</i>	$41 \cdot 10^{-6}$	$20 \cdot 10^{-3}$	1,2 (2)
2-isobutil-3-metoxipirazina	<i>pimiento verde</i>	$2 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-6}$ (2)
2-furfuriltiol	<i>asado</i>	$70 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$0,4 \cdot 10^{-6}$ (4)
Hexanal	<i>herbáceo</i>	$35 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-3}$	0,35 (1)
Sotolón	<i>especiado</i>	$15 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$ (3)
Linalool	<i>floral</i>	$0,5 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$70 \cdot 10^{-3}$ (3)
Metional	<i>patata</i>	$0,1 \cdot 10^{-6}$	$0,1 \cdot 10^{-3}$	$0,5 \cdot 10^{-3}$ (2)
2-feniletanol	<i>rosas</i>	$15 \cdot 10^{-6}$	1	$125 \cdot 10^{-3}$ (3)
Vainillina	<i>vainilla</i>	$0,8 \cdot 10^{-6}$	$25 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$ (3)

**Tabla 1.** Umbral olfativo de distintas sustancias en diferentes matrices. (1) cerveza; (2) disolución hidroalcohólica; (3) dispersión sobre celulosa; (4) carne

Fruto de esta necesidad en el análisis sensorial se propuso el concepto de valor de aroma de una sustancia odorífera, el cual se define como el cociente entre la concentración de la sustancia y su umbral de percepción olfativo. De este modo, se considera que una sustancia no participará en el aroma del producto evaluado si su valor de aroma es menor que la unidad, y sí que lo hará cuando dicho valor sea mayor que uno. Esto explica el porqué sustancias con umbral de detección muy bajo pueden contribuir enormemente al aroma de un alimento o bebida, aun estando a concentraciones también muy bajas, mientras que otras sustancias a concentraciones altas no contribuirán al olor por tener un umbral de percepción elevado. No obstante, hay que tener en cuenta que los valores de aroma tienen que considerarse aproximaciones en la cuantificación de las intensidades aromáticas, ya que en su cálculo no se consideran efectos sinérgicos o antagonicos, los cuales son de difícil evaluación.

Las primeras nociones claras sobre este particular se obtuvieron investigando mezclas. Con ellas se demostró que, en el caso de componentes con notas aromáticas similares, las intensidades son aditivas, pero que la intensidad de la mezcla suele ser menor que la suma de las intensidades individuales. Sin embargo, en las sustancias olorosas que se diferencian claramente por su nota

aromática, se encontró que el perfil aromático de una mezcla sólo es la suma de los perfiles aromáticos de los componentes cuando las intensidades son similares [1], ya que si no, predomina la más intensa, suprimiendo el resto.

Además, tampoco podemos olvidar que dado que, normalmente, los aromas que percibimos no pertenecen a un compuesto aislado sino que forman parte de una matriz más o menos compleja, cuando se habla del carácter aromático de una sustancia, también hay que tener en cuenta las interacciones con los otros constituyentes de esa matriz. Por ello, y a título de ejemplo, en el caso de los alimentos son importantes las interacciones con lípidos, proteínas y carbohidratos ya que estos afectan, entre otras cosas, a la retención de sustancias volátiles en el alimento, lo que disminuye su concentración en la fase gaseosa. Consecuentemente, estas interacciones afectan a la intensidad y calidad del aroma que percibimos. Otro punto a tener en cuenta es la modificación que pueden sufrir las sustancias aromáticas dependiendo de las condiciones del medio en el cual se encuentran, como pueden ser el pH, la polaridad, la presencia de oxígeno... Toda esta complejidad hace que los investigadores de este campo le sigan dedicando muchos esfuerzos.

## 1.2. Sustancias aromáticas con carácter impacto

De entre todas las sustancias aromáticas, merecen una atención especial aquellas que proporcionan a un producto la esencia característica de su olor. Son los denominados compuestos clave (key substances) o compuestos con carácter impacto. Esto no significa que estas sustancias sean las que se encuentran en mayor concentración, sino que son las que tienen un valor de aroma más importante.

En la **Tabla 2** se presentan algunos ejemplos de estos compuestos, en una selección de alimentos, junto con el descriptor del olor del compuesto químico [1, 2, 9-13]. En algunos casos, tal y como muestran los primeros ejemplos de la Tabla 2, es el olor del compuesto con carácter impacto el que proporciona básicamente la identidad sensorial al alimento en cuestión. Es decir, las setas huelen como huelen debido a la presencia de la 1-octen-3-ona en su aroma. Sin embargo, tal y como muestran los últimos ejemplos de la Tabla 2, también se consideran compuestos con carácter impacto aquéllos que son responsables de notas aromáticas características en perfiles aromáticos complejos de manera que, aunque no se perciba su olor claramente, contribuyen de manera decisiva al aroma global. En este caso, el aroma del alimento que percibimos se debe a la presencia de varios compuestos con carácter impacto. Éste sería, por ejemplo, lo que ocurre con la presencia de la geosmina, que huele a tierra y humedad, en el aroma de la remolacha. Aunque la remolacha no sólo huele a tierra o humedad, su aroma tiene una componente importante que nos recuerda a



estas notas aromáticas por lo que, aunque la geosmina no huele a remolacha, está claro que es un compuesto que tiene carácter impacto en este alimento.

<b>Compuesto</b>	<b>Descriptor</b>	<b>Alimento</b>
<b>Neral/geranial</b>	Limón	Limón
<b>2-trans-6-cis-nonadienal</b>	Pepino	Pepino
<b>1-octen-3-ona</b>	Champiñón	Setas
<b>2-trans-4-cis-decadienato de etilo</b>	Pera	Pera
<b>2-isobutil-3-metoxipirazina</b>	Pimiento verde	Pimiento verde
<b>2-propenil-2-propeniosulfonato</b>	Ajo	Ajo
<b>Furaneol</b>	Caramelo	Fresas, piña
<b>Geosmina</b>	Terroso	Remolacha
<b>4-fenil-2-butanona</b>	Caramelo	Frambuesa
<b>2-heptanona</b>	Queso azul	Leche
<b>Z-3-hexenal</b>	Papel	Tomate
<b>4-mercapto-4-metil-2-pentanona</b>	Boj	Vino Sauvignon
<b>Benzaldehído</b>	Almendras amargas	Almendras
<b>E-2-nonenal</b>	Pesado, pepino	Corteza del pan

**Tabla 2.** Ejemplos de compuestos aromáticos con carácter impacto

### 1.3. Análisis del Aroma

Como ya se ha dicho, el aroma de una sustancia puede ser más o menos complejo. En el caso concreto de las bebidas alcohólicas, esta complejidad resulta evidente puesto que su aroma está compuesto por un gran número de sustancias que se encuentran en concentraciones muy distintas – desde g/L a ng/L-, pertenecientes a familias químicas diferentes –ácidos, ésteres, lactonas, fenoles, etc.- y con propiedades físicas y químicas diversas -polaridad, volatilidad, etc.-.

La complejidad de estas muestras aromáticas y las bajas concentraciones de algunos de sus componentes (incluso hasta los  $10^{-10}$  g/L) hacen que su análisis dependa del desarrollo de las técnicas analíticas y, más concretamente, de la cromatografía de gases (CG). En este campo, el uso de sistemas de detección, ya sean específicos o universales, ha hecho que la mayor parte de la investigación realizada sobre la composición del aroma se haya centrado más en el análisis de los compuestos volátiles que en el análisis del aroma en sí. Además, cuando la investigación se ha

dirigido hacia los componentes aromáticos, lo ha hecho centrándose no tanto en el aroma global, sino en la identificación de compuestos responsables de olores característicos y específicos. Por ello, hoy en día, ha cobrado especial interés la investigación que tiene como objetivo determinar el número, tipo e importancia relativa de los odorantes que realmente participan en el aroma de un producto. Dentro de este contexto toma especial relevancia el uso de la cromatografía de gases acoplada a un detector olfatométrico -u olfatométrico, como otros autores prefieren denominarlo-, la cual permite la evaluación sensorial de los compuestos que eluyen de la columna cromatográfica por medio de la nariz humana.

## 2.- GCO

La cromatografía de gases con detección olfatométrica o GCO (acrónimo del inglés Gas Chromatography-Olfactometry), se basa en la evaluación sensorial de los compuestos químicos que eluyen de la columna cromatográfica con el objetivo de determinar cuáles de éstos huelen, es decir, cuáles son activos aromáticamente hablando. Para ello se utiliza como detector la nariz de una persona adecuadamente entrenada, de manera que sea capaz de percibir, describir y cuantificar la intensidad aromática de los compuestos que eluyen, separados, de la columna cromatográfica. La determinación del olor de los distintos analitos es posible gracias a la presencia de un complemento especial en el cromatógrafo llamado puerto olfatométrico, el cual se conecta en paralelo a un detector químico convencional (generalmente un detector de ionización de llama FID o un espectrómetro de masas MS). De este modo, cuando inyectamos una muestra, el eluato se divide de tal manera que alcanza ambos detectores simultáneamente, permitiendo relacionar la información química que aportan los detectores convencionales con la información sensorial que aporta el detector olfatométrico (**figura 2**). Hay que destacar que resulta especialmente útil la combinación del detector olfatométrico con el espectrómetro de masas, ya que con éste se puede llegar a identificar cuáles son los compuestos volátiles aromáticamente activos.

Desde la primera vez que se usó la nariz humana como detector cromatográfico por parte de Fuller y sus colaboradores en el año 1964 [14], han sido varias las mejoras que se han llevado a cabo. La mayoría de ellas han ido dirigidas a solventar los problemas de reproducibilidad debidos en gran medida a la olfacción de un efluente de gas seco y caliente. Para evitar este problema se suele mezclar aire humidificado con el efluente caliente, de forma que se reduce significativamente la deshidratación nasal, la cual puede afectar de manera importante a la capacidad olfativa del individuo que realiza el análisis olfatométrico. Sin embargo, aunque en la mayoría de las aplicaciones de la GCO los analistas están perfectamente entrenados y familiarizados con la técnica, no podemos

olvidar que ésta presenta unas limitaciones inherentes al uso de la nariz humana que también pueden repercutir sobre la reproducibilidad. Ejemplos de estas limitaciones son el cansancio, la anosmia y la saturación del olfato del analista, así como las condiciones físicas y ambientales en las que se lleva a cabo el análisis, lo cual alarga bastante el tiempo de análisis en general. Además, también hay que tener en cuenta que el orden de elución, el carácter aromático y la intensidad percibida para un determinado compuesto pueden afectar directamente a la intensidad con que se percibe el que eluye inmediatamente después. Este efecto puede corregirse fácilmente modificando el orden de elución de los compuestos mediante la variación de parámetros cromatográficos como la temperatura o la presión, e incluso variando el tipo de columna cromatográfica.

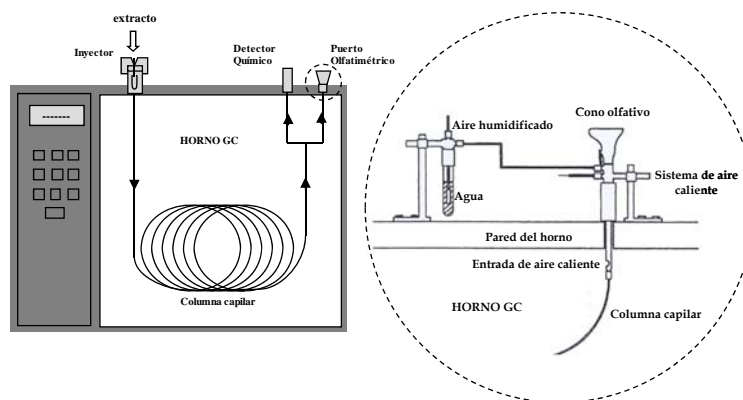


Figura 2. Esquema de un cromatógrafo de gases con detector olfatométrico

La singularidad de la técnica de la GCO ha hecho que se haya convertido en una herramienta esencial para el análisis y la caracterización del aroma. Uno de los campos de mayor aplicación es el de los alimentos y las bebidas. Los estudios sobre la caracterización del aroma de distintos productos, la contribución de compuestos volátiles específicos a un aroma determinado o la identificación de la causa de algunos olores desagradables son los más usuales. En todos los casos existen distintos factores que determinan la calidad de los datos obtenidos utilizando esta técnica, como las condiciones cromatográficas empleadas, el diseño del puerto olfatométrico o el entrenamiento sensorial y la sensibilidad de los analistas, ya que todo ello condicionará de manera importante la percepción de los aromas.

Desde un punto de vista más analítico, para que la caracterización del aroma resulte exitosa, ésta dependerá también de la técnica de pretratamiento que se utilice para aislar los compuestos volátiles de la muestra del resto de la matriz. El gran número de compuestos volátiles normalmente presentes en los alimentos y bebidas, las diferencias en sus propiedades físicas y químicas y, en

muchos casos, los bajos niveles de concentración en los que se encuentran, hacen que su aislamiento de manera representativa sea un reto importante.

Sin embargo, la representatividad del extracto no es un término absoluto, sino que depende del objetivo de la investigación. Así, si el estudio está centrado en un compuesto concreto o en una familia de compuestos, el requisito más importante que debe cumplir el extracto es presentar una elevada recuperación de los compuestos de interés. Sin embargo, si el objetivo es, por ejemplo, comparar el aroma de dos muestras diferentes, para que el extracto resulte adecuado deberá contener todos los compuestos importantes del aroma del alimento en cuestión y en unas proporciones adecuadas. En este último caso, una manera de comprobar la representatividad del extracto consiste en llevar a cabo estudios sensoriales, mediante tests triangulares o descriptivos, con el fin de comparar el aroma del extracto obtenido con el del producto original [14, 15].

En general, no existe ninguna técnica ideal para la extracción de los compuestos volátiles de los alimentos o bebidas. De hecho, la técnica utilizada condicionará de manera decisiva los resultados obtenidos. La elección del método de extracción depende tanto del tipo de muestra como de los objetivos que se pretendan conseguir y, casi siempre, supone un compromiso [16, 17]. De esta manera, si se comparan las técnicas de espacio de cabeza con las de extracción total de la muestra (extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, destilación, destilación-extracción simultánea), puede pensarse que las primeras aportan una información más real, ya que el espacio de cabeza es la fracción que la nariz detecta cuando olemos la muestra. Sin embargo, todo este razonamiento es teórico ya que, en la práctica, se ha comprobado que la técnica del espacio de cabeza estático presenta baja sensibilidad y que la técnica del espacio de cabeza dinámico, aunque permite llegar a límites de detección muy bajos, puede comportar problemas como la generación de artefactos o efectos de memoria, debidos a compuestos que quedan fuertemente retenidos en la trampa y que pueden aparecer en análisis posteriores. Por otro lado, las técnicas de extracción que utilizan disolventes orgánicos suelen favorecer la extracción de los compuestos más afines al disolvente empleado, lo cual puede ser una ventaja cuando se pretende la extracción de unos determinados componentes del aroma, pero que también puede constituir un problema cuando no se persigue esta selectividad. Este mismo problema lo podemos encontrar cuando se trabaja con técnicas de extracción en fase sólida, sólo que en este caso el factor limitante es el absorbente utilizado. Respecto a las técnicas que requieren un aporte de temperatura, como ocurre con la destilación, hay que tener en cuenta que este parámetro puede ocasionar el deterioro de la muestra o la aparición de artefactos [15-17]. Y, así, podríamos seguir enumerando las distintas ventajas e inconvenientes de las diferentes técnicas de separación de los componentes volátiles. No obstante, teniendo en cuenta que el resultado de cualquier estudio en el que se utilice la GCO dependerá de la

representatividad del extracto, resulta obvio que habrá que invertir un tiempo sustancial en la comparación de las distintas técnicas para elegir la o las -puesto que se puede utilizar una combinación de varias de ellas- que mayor representatividad aromática proporcionen.

Una vez se ha obtenido un extracto aromático representativo de la muestra que se pretende analizar, con la técnica de la GCO se posee una herramienta que permite identificar los compuestos químicos de dicho extracto que presentan olor. Sin embargo, en el análisis del aroma no basta con esto sino que, además, es necesario determinar la importancia relativa de cada uno de los olores en el aroma global de la muestra. Con este fin se han desarrollado diferentes técnicas olfatométricas que se exponen seguidamente. Aunque todas ellas presentan ventajas, hay que decir que también presentan inconvenientes, lo que demuestra que el problema no está definitivamente resuelto.

### **3.- Técnicas olfatométricas**

El primer intento de evaluar la contribución sensorial de un compuesto al aroma de una sustancia fue llevado a cabo en el año 1963, antes del desarrollo de la GCO, cuando Rothe y Thomas calcularon la relación entre la concentración del compuesto en la muestra y su umbral de percepción sensorial [18]. A esta relación la denominaron "valor de aroma". Según esta teoría, tal y como ya se ha introducido en el apartado 1.1, aquellos compuestos que presenten un valor de aroma superior a la unidad influirán en el aroma de la sustancia en cuestión. Esta manera de evaluar la importancia sensorial de los compuestos volátiles requiere, por lo tanto, la cuantificación y la determinación del umbral de percepción sensorial de cada uno de los compuestos odorantes de la muestra, lo cual supone una inversión de tiempo considerable.

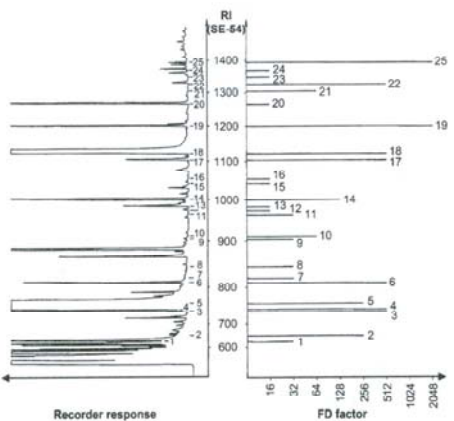
Con el objetivo de obtener una estimación de la importancia sensorial de los diferentes compuestos en el aroma de una muestra de una manera más sencilla, se han ido desarrollando distintas técnicas olfatométricas. En función del tipo de medida que se utiliza, éstas se pueden clasificar en: técnicas de dilución, técnicas de tiempo-intensidad, técnicas de intensidad posterior y técnicas de frecuencia de detección. A continuación se describen todas ellas, indicando sus ventajas y sus inconvenientes.

#### **3.1. Técnicas de dilución**

Estas técnicas consisten en analizar mediante la GCO un extracto del aroma de la sustancia de interés para determinar a qué tiempos de retención aparecen olores. Posteriormente, se llevan a cabo diluciones sucesivas del extracto, normalmente con el mismo disolvente orgánico utilizado para su obtención, que también se analizan olfatométricamente. A medida que aumenta la dilución

del extracto van detectándose menos olores en su análisis mediante la GCO, hasta llegar a una dilución en la que ya no se percibe ningún olor. Para cada compuesto se determina su factor de dilución como la última dilución a la que se ha detectado su olor. Cuanto mayor es el factor de dilución de un compuesto, mayor es su contribución al aroma de la sustancia en cuestión. De esta manera se obtiene una clasificación jerarquizada de los compuestos olorosos según su importancia aromática.

Las dos técnicas de dilución principales son el CHARM (Combined Hedonic Aroma Response Measurements), desarrollada por Acree y colaboradores [19], y el AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) desarrollada por Grosch y colaboradores [20, 21].

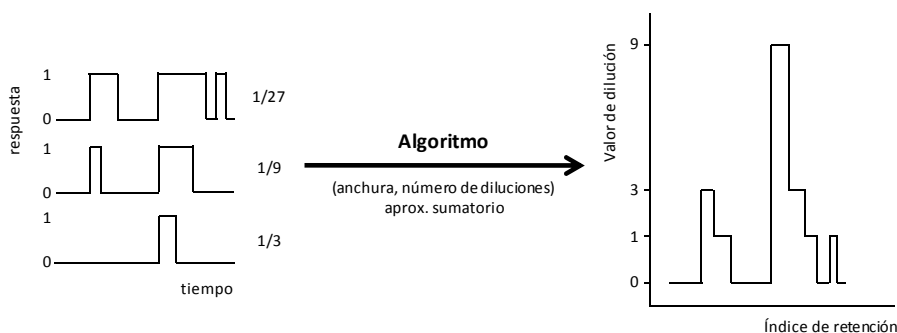


**Figura 3.** Cromatograma (izquierda) y aromagrama (derecha) obtenidos simultáneamente con detectores FID y Olfatómico al aplicar la técnica AEDA a un extracto del aroma de una cerveza Pilsner [22].

La técnica AEDA es la más sencilla de las dos, ya que en ésta el analista sólo tiene que concentrarse en la detección de los olores y en la descripción de los mismos. El resultado se expresa como el factor de dilución que, como ya se ha dicho, es la máxima dilución a la que aún se detecta el olor. La representación de los factores de dilución frente el tiempo de retención (o frente a los índices de Kovats) se denomina aromagrama. En la **figura 3** se muestra un ejemplo de aromagrama correspondiente al análisis de un extracto del aroma de una cerveza utilizando esta técnica [22]. Como se puede observar, en la parte derecha de la figura se especifican los valores de los factores de dilución para los distintos olores detectados. En la parte izquierda, se presenta el cromatograma que se obtiene simultáneamente con un detector FID. De este modo puede verse de manera gráfica lo que ya se ha comentado sobre el hecho de que una gran cantidad de un compuesto volátil (lo cual dará lugar a una señal cromatográfica importante) no tiene por qué implicar una gran importancia sensorial en un alimento (lo que se traducirá en un valor del factor de dilución elevado).

En lo que a la técnica CHARM se refiere, el analista, además de describir el olor que detecta tiene que señalar el momento en el que empieza el olor y el momento en el que termina. Esto se consigue con un dispositivo conectado a un sistema informático en el que el analista tiene que apretar un botón cuando detecta el olor, manteniéndolo presionado hasta que dicho olor cambia o desaparece. De esta manera el sistema informático registra el intervalo de tiempo que dura cada olor. En este caso, además del factor de dilución, para la construcción del aromagrama también se tiene en cuenta la duración del olor, lo cual hace que tenga un aspecto más parecido a un cromatograma [23].

La **figura 4** muestra de manera esquemática cómo se construyen los aromagramas con la técnica CHARM. En el análisis de cada dilución, el intervalo del tiempo de retención de cada olor se representa mediante una señal cuadrada. El diagrama final se construye superponiendo las señales cuadradas para cada dilución analizada. El área de esta señal se conoce como el valor CHARM, y es el que se utiliza para cuantificar la potencia aromática, mientras que la altura corresponde al factor de dilución [17].



**Figura 4.** Esquema de la construcción de los aromagramas CHARM.

Como ya se ha comentado con anterioridad, la obtención del extracto aromático es uno de los pasos más críticos de los métodos olfatométricos puesto que tiene que extraerse de manera representativa un gran número de compuestos volátiles de diferente naturaleza química. Además, teniendo en cuenta que estos compuestos suelen hallarse a concentraciones bajas, en la mayoría de los casos, es necesario concentrar el extracto. Este proceso puede comportar pérdidas importantes de algunos compuestos olorosos que falsearán los resultados finales, ya que la potencia aromática de estos compuestos se verá subestimada en el análisis olfatométrico. Con el objetivo de evitar este problema se desarrolló la técnica AECA (Aroma Extract Concentration Analysis), una técnica que conceptualmente puede considerarse de dilución, pero en la que en vez de analizarse por GCO

sucesivas diluciones del extracto, lo que se analizan son sucesivas concentraciones del mismo [24]. Es decir, en el AEDA se analizan por GCO diluciones de un extracto que se ha obtenido extrayendo los compuestos volátiles de la matriz y concentrándolos, mientras que en el AECA se analiza por GCO el extracto obtenido aislando los compuestos de la matriz, pero sin someterlos a un proceso posterior de concentración. Después, mediante la eliminación del disolvente, se va concentrando el extracto de manera sucesiva y en cada paso de concentración se analiza una alícuota de la muestra por GCO. De esta manera se determinan también los olores que pueden perderse durante el proceso de concentración.

Tal y como se ha expuesto, en la mayoría de los métodos descritos que utilizan las técnicas de dilución, el extracto de la muestra que se analiza es líquido y sus diluciones se realizan con un disolvente orgánico adecuado. Sin embargo, se han desarrollado algunos métodos en los que el extracto analizado no es un líquido, por lo que han tenido que buscarse alternativas para poder trabajar con diluciones de las muestras. Así, Guth y Grosch propusieron una nueva modalidad del AEDA combinando la técnica del espacio de cabeza con la GCO [25]. En este caso la dilución se obtenía inyectando volúmenes decrecientes del espacio de cabeza en el cromatógrafo de gases. Por otro lado, Deibler y colaboradores desarrollaron otro método en el que utilizaban la microextracción en fase sólida o SPME (acrónimo del inglés Solid-Phase Microextraction) como técnica de extracción y conseguían el efecto de la dilución, para calcular los valores CHARM, utilizando fibras de diferente grosor y de diferentes longitudes [26]. Esta misma técnica de extracción en fase sólida también ha sido utilizada para la caracterización del aroma del vino. En este caso se aplicó una variante de la técnica de dilución AEDA que consiste en determinar los factores de dilución a partir de los análisis olfatométricos de los extractos de sucesivas diluciones de la propia muestra [27].

Las técnicas AEDA y CHARM son técnicas que nos proporcionan una idea aproximada de la contribución de los compuestos al aroma de una sustancia, pero en ningún caso los resultados pueden considerarse de manera categórica. De hecho, la interpretación de los datos obtenidos tras aplicar la GCO es una etapa crítica, ya que estas técnicas están basadas en los umbrales de percepción sensorial de los compuestos volátiles en el aire y no en la propia muestra. Esto es así porque, cuando se llevan a cabo los análisis olfatométricos, los compuestos olorosos del extracto son separados cromatográficamente de manera que se evalúan individualmente a su salida de la columna cromatográfica. Sin embargo, el comportamiento y también la volatilidad de los compuestos en los alimentos dependen de su solubilidad en la matriz, así como de las interacciones con los componentes de la matriz que no son volátiles. Por este motivo, en muchos casos se utilizan estas técnicas como un paso previo a la determinación de los valores de aroma [28]. De este modo,



se simplifica mucho el trabajo ya que sólo se determina el valor de aroma de aquellos compuestos que han dado como resultado una potencia aromática importante en el análisis olfatométrico.

Una vez determinados cuáles son los compuestos con un impacto sensorial importante en el aroma de una muestra es necesario llevar a cabo estudios de recombinación para verificar los resultados obtenidos [17]. Estos estudios consisten en elaborar una muestra sintética a partir de la combinación de los compuestos con importancia sensorial a las concentraciones en que se encuentran en la muestra real y, mediante un panel de catadores, determinar cuánto se parece el aroma de la muestra sintética al aroma de la muestra real. Después, mediante estudios de supresión que consisten en evaluar de manera consecutiva las muestras sintéticas, pero eliminando un determinado compuesto, puede conocerse el papel real que juega este compuesto en el aroma de la sustancia analizada.

Las técnicas de dilución, como cualquier otra técnica, presentan una serie de inconvenientes y, muchos de ellos provienen del hecho de no cumplir las leyes psicofísicas de la percepción aromática. Estas técnicas asumen que la respuesta a un estímulo olfativo es lineal con la dilución y que todos los compuestos tienen la misma pendiente de respuesta cuando aumenta su concentración [29]. Sin embargo, estas asunciones se contradicen con la ley psicofísica de Stevens que muestra que la relación entre la intensidad aromática y la concentración es exponencial:

$$I = k (C - T)^n$$

En esta ecuación, I es la intensidad aromática, C es la concentración, T es el umbral de percepción sensorial, k es una constante de proporcionalidad que depende de cada compuesto y n es otra constante que puede variar entre 0.3 y 0.8. Según esta ley, dos compuestos que se encuentren a la misma concentración y que tengan unos umbrales de percepción sensorial muy parecidos, pero que presenten exponentes (n) diferentes, presentarán intensidades de olor muy distintas y por lo tanto no contribuirán de la misma forma al aroma global de la sustancia.

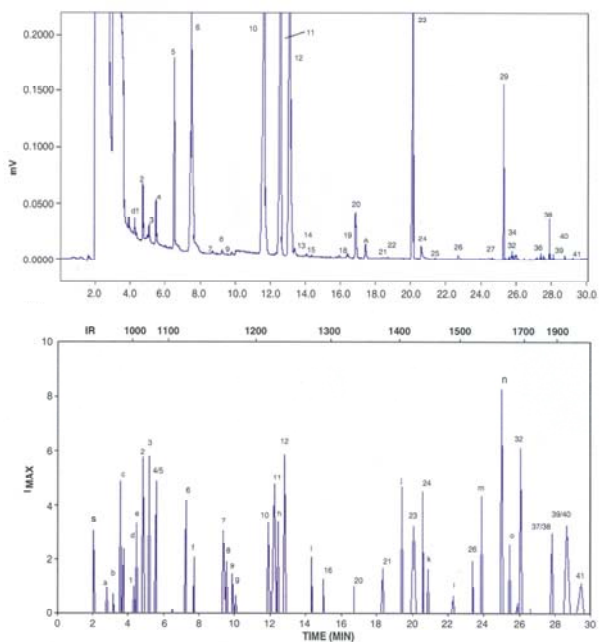
Otro inconveniente de las técnicas de dilución es la gran cantidad de tiempo que requieren, ya que el estudio de una muestra puede durar varios días. Hay que tener en cuenta que se tienen que analizar olfatométricamente el extracto de la muestra y las diluciones que se hagan del mismo hasta que no se perciba ningún olor y, en muchos casos, el número de diluciones necesarias para llegar a este punto puede ser importante. Por otra parte, deben hacerse repeticiones de los análisis de cada dilución. A todo esto hay que añadir que el número de análisis olfatométricos que puede realizar un analista en un día es limitado debido a los problemas olfativos que le puede causar el hecho de estar oliendo un efluente de gases caliente durante un tiempo demasiado prolongado [3, 15, 29].

A pesar de los inconvenientes citados para las técnicas de dilución, éstas son hasta el momento las más utilizadas para llevar a cabo una estimación de la contribución sensorial de los diferentes compuestos volátiles al aroma de los alimentos, debido principalmente a su sencillez en el procesamiento de la señal y a que no requieren instrumentación sofisticada, sobretodo la técnica AEDA. Además, la componente de subjetividad por parte del analista que existe en otras técnicas, las cuales se explican a continuación, no existe en las técnicas de dilución, ya que en éstas el analista sólo tiene que indicar si percibe o no un olor, y en el caso del CHARM indicar, además, el momento en que éste empieza y acaba [17, 29].

### 3.2. Técnicas de tiempo-intensidad

Estas técnicas se basan en la evaluación de la intensidad del olor. McDaniel y colaboradores fueron los primeros en desarrollar una técnica de tiempo-intensidad a la que denominaron OSME [30, 31]. Este nombre deriva de la palabra griega que significa olor. En esta técnica el analista utiliza un dispositivo consistente en un cursor que se mueve 150 mm longitudinalmente y que está conectado a un sistema informático con el que se señala la intensidad del olor en un rango de 0 a 15. Además se registra el tiempo de retención y la descripción del olor. La representación de las intensidades de los olores frente el tiempo de retención se denomina osmeograma y proporciona una representación gráfica de la importancia sensorial de los compuestos en el aroma global de la sustancia. El análisis pueden realizarlo varios analistas (los investigadores que los desarrollaron utilizan cuatro) y con el tratamiento que se realiza a los datos obtenidos por todos ellos, el aspecto final que presenta el osmeograma es muy semejante al de un cromatograma. En la **figura 5** se muestran los perfiles aromáticos de un extracto del aroma de una bebida alcohólica procedente de la fermentación de anacardos, utilizando la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (FID) en la parte superior, y utilizando la cromatografía de gases con detección olfatométrica y la técnica OSME en la parte inferior [32].

Aunque en general las intensidades de los olores detectados a la salida de la columna cromatográfica presentan una buena correlación con la concentración de los compuestos responsables de los olores, sorprendentemente los investigadores que utilizan esta técnica interpretan las diferencias entre osmeogramas basándose en las frecuencias de detección de los olores (técnica que se explica más adelante), y no en la estimación de las intensidades que es lo que establece la técnica OSME. Algunos autores atribuyen este hecho a que esta técnica presenta demasiadas dificultades, ya que se observa una gran discrepancia entre los diferentes analistas tanto en el número de compuestos detectados como en la calidad de sus olores [33, 34]



**Figura 5.** Perfiles aromáticos de una bebida alcohólica procedente de la fermentación de anacardos utilizando la GC-FID (arriba) y la GCO con la técnica OSME (abajo) [32].

Con el propósito de solucionar estas limitaciones de la técnica OSME, un grupo de investigadores del Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) de Dijon desarrolló otra técnica de tiempo-intensidad a la que llamaron Finger Span Cross Modality Matching (FSCM) [34-36]. Esta técnica se diferencia del OSME en el modo de evaluar la intensidad. En el FSCM el analista señala la intensidad del olor que percibe separando el dedo pulgar y otro dedo, que puede ser el índice o el corazón, mediante un dispositivo. Cuanto mayor es la distancia entre los dos dedos, más intenso es el olor. Esta forma de evaluar la intensidad de un estímulo olfativo había sido descrita en estudios psicofísicos realizados a la década de los sesenta y de los setenta [36]. El diagrama que se obtiene en la representación de las intensidades frente el tiempo de retención es muy similar a un osmeograma. Mediante el uso de soluciones sintéticas se ha comprobado que existe una relación logarítmica entre los valores de altura de pico de este diagrama y la concentración del compuesto responsable del estímulo.

La ventaja que presenta el FSCM frente al OSME es que la medida de intensidad de los olores es mucho más rápida, ya que los analistas sólo tienen que separar los dedos de manera intuitiva y no tienen que perder tiempo buscando con el cursor la intensidad correspondiente. Hay que tener en

cuenta que, la mayor parte de las veces, la duración de los olores oscila entre uno y pocos segundos, por lo que la rapidez en la medida es un factor clave [35].

Comparando las técnicas de tiempo-intensidad con las técnicas de dilución, dado que las primeras se basan en la evaluación de la intensidad del olor, sus principios no están en desacuerdo con las leyes psicofísicas de la percepción olfativa como pasaba con las técnicas de dilución. En cuanto al tiempo que requieren para caracterizar aromáticamente una muestra, también presentan claras ventajas respecto a las técnicas de dilución, ya que en este caso sólo es necesario realizar el análisis del extracto de la muestra. No obstante, en la determinación de la importancia aromática de los diferentes compuestos, para las técnicas de tiempo-intensidad existe una componente importante de subjetividad por parte del analista a la hora de medir las intensidades de los olores, la cual es mucho menor, por no decir prácticamente inexistente, en las técnicas de dilución.

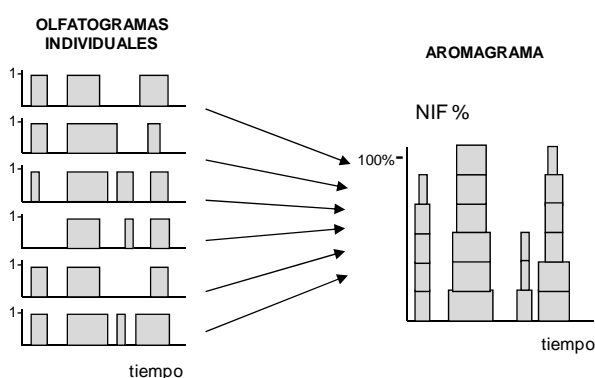
### **3.2.1. Técnicas de intensidad posterior**

Estas técnicas, del mismo modo que las técnicas de tiempo-intensidad descritas, consisten en medir la intensidad del olor. La diferencia reside en que, en este caso, el analista evalúa la intensidad del olor percibido una vez que el compuesto ya ha eluido de la columna cromatográfica [3]. Por esta razón, algunos autores las clasifican en un grupo diferente a las anteriores [29]. Para llevar a cabo el análisis olfatométrico utilizando las técnicas de intensidad posterior, el panel de analistas debe puntuar las intensidades en una escala previamente fijada. La media de los valores de intensidad de todos los analistas es la medida de intensidad que se le da a cada olor, con lo cual, al trabajar con valores medios de un panel de analistas, se reduce la subjetividad de manera considerable. Algunos de los trabajos que se han realizado utilizando esta técnica muestran que las intensidades evaluadas con ella presentan una buena correlación con la concentración de los compuestos responsables de los olores, por lo que las técnicas de intensidad posterior se pueden utilizar con fines cuantitativos [37, 38].

### **3.3. Técnicas de frecuencia de detección**

En este tipo de técnicas, la medida de la intensidad aromática de un determinado compuesto se basa en el número de analistas que han detectado su olor [39, 40]. El análisis olfatométrico es llevado a cabo por un panel de analistas que, mediante un sistema informatizado, registran el tiempo de retención al que se detectan olores así como su duración. El aromagrama se construye con los datos obtenidos de todos los miembros del panel, de manera parecida a como se construyen los

aromagramas CHARM. La **figura 6** muestra de manera esquemática cómo se construyen los aromagramas de la muestra analizada a partir de los olfatogramas de cada analista. En el gráfico final, la altura de pico corresponde al número de analistas que han detectado un olor a ese tiempo de retención, mientras que el área está relacionada con el tiempo de duración de los olores. Después de normalizar a 100 (olor detectado por todos los miembros del panel), la altura del pico resultante indica la frecuencia de detección de ese olor por parte del panel. La altura y el área del pico se denominan NIF (Nasal Impact Frequency) y SNIF (Surface of Nasal Impact Frequency), respectivamente [41].



**Figura 6.** Técnicas de frecuencia de detección. Esquema de la construcción de un aromagrama NIF a partir de los olfatogramas de cada analista.

Al igual que las técnicas de tiempo-intensidad, las técnicas de frecuencia de detección cumplen las leyes psicofísicas de la percepción aromática. Además, como el análisis lo realiza un número importante de analistas, permite aplicar tests estadísticos a los datos obtenidos.

Aunque se ha comprobado que las técnicas de frecuencia de detección pueden utilizarse con fines cuantitativos [42], dado que requieren un gran número de análisis olfatimétricos, los mismos autores del trabajo recomiendan utilizarlas solamente en casos en los que sea difícil utilizar otro tipo de detección (concentración de los analitos de interés en la muestra inferior a la sensibilidad de los detectores químicos, coelución de compuestos, etc).

#### 4.- Aplicación de la GCO al análisis de bebidas alcohólicas

Como ya se ha comentado a lo largo del artículo, el objetivo más usual de la aplicación de la GCO en todos los ámbitos y, de manera concreta, en el análisis de las bebidas alcohólicas, es la

caracterización del perfil aromático de una muestra para poder determinar la importancia relativa de los compuestos aromáticamente activos en el aroma global. Sin embargo, no podemos olvidar otros objetivos que estarían más relacionados con la determinación de compuestos impacto o con el control de calidad. En la **tabla 3** se muestran distintas aplicaciones de la GCO a diferentes tipos de muestras.

#### 4.1. Caracterización del aroma

Aunque en la bibliografía existen numerosos trabajos sobre la determinación de la composición volátil de distintas bebidas alcohólicas, cuando nos centramos en la relación entre esta composición volátil y las propiedades organolépticas del producto analizado, el número de estudios es considerablemente menor, aunque nada desdeñable. De hecho, aún considerando la dificultad que entraña el hecho de trabajar con un detector humano, encontramos estudios sobre caracterización de aromas de cervezas [22, 43, 44], vinos [27, 33, 45-50], whiskys [51, 52], tequila [53, 54], champagne [55], cava [56], ron [57] e incluso de algunos licores chinos [58-60]. En la mayoría de estos estudios lo que se pretende es una jerarquización de la contribución de los distintos componentes odorantes en el aroma global para obtener lo que sería una huella digital -única e irrepetible- del aroma del producto analizado. Además, dado que las bebidas alcohólicas características de una región o elaboradas con un procedimiento concreto, generalmente se caracterizan por su tipicidad, el uso de la GCO para determinar el distinto perfil aromático de cada zona o variedad resulta de gran ayuda y eficacia. Sin embargo, hay otros estudios que van más allá y utilizan esta huella digital para hacer comparaciones, por ejemplo, de cervezas con o sin lúpulo, y establecer similitudes y diferencias para llegar a determinar el efecto que tiene este distinto tratamiento sobre el aroma final [61], o para diferenciar el aroma de tequilas con distintos tiempos de permanencia en barrica [54]. En otros casos lo que se pretende con estas caracterizaciones es llegar a obtener lo que sería el aroma base de un producto determinado. Éste es el caso, de un estudio de distintos vinos tintos jóvenes a partir de los cuales se demostró que el aroma base del vino tinto se debe a la presencia de unos 20 compuestos, los cuales le proporcionan un aroma básico frutal, graso/láctico y alcohólico, constituido principalmente por ácidos grasos, alcoholes y, sobre todo, ésteres. Junto a estos compuestos aparecen otros cuyos olores no predominan, pero sí enriquecen el aroma con notas sutiles florales, lactónicas o fenólicas [45].

#### 4.2. Determinación de compuestos impacto

La complejidad aromática de las bebidas alcohólicas se halla directamente relacionada con su procedencia ya que ésta condicionará tanto la materia prima utilizada en su elaboración como las tecnologías empleadas. La tipicidad que aportan estos factores es la que permite que cada zona geográfica ofrezca unos productos significativamente distintos a los de otras zonas aunque la materia prima o la tecnología utilizadas sean las mismas.

Muchas veces, esta tipicidad propia de cada región, marca, denominación de origen, etc. está relacionada con la presencia de determinados compuestos con carácter impacto. De ahí el que no sean pocos los estudios en los que se lleva a cabo una caracterización del aroma con el fin de determinar cuáles de los componentes del aroma global tienen este carácter impacto que confiere al producto final la esencia característica de su aroma. De este modo, Fritsch y colaboradores estudiaron los compuestos con carácter impacto de una cerveza Pilsner de la zona de Baviera [22], Aznar y colaboradores determinaron los de vino de la Rioja [62], Ferrari y colaboradores, los del coñac [63] y Poisson y colaboradores hicieron lo propio con el whisky [52]. Aunque, en general, estos compuestos pueden tener muy distinta naturaleza química, se sabe que hay algunas familias de compuestos químicos que poseen alguna propiedad aromática que los hace especialmente interesantes. Éste es el caso de los compuestos azufrados muchos de los cuales, incluso a niveles traza, poseen olores característicos, por lo que han sido objeto de estudio de manera específica, por ejemplo, en cerveza [64], vino [65] o champagne [66].

La dificultad en la investigación de los compuestos impacto se asocia a la complejidad de los estudios de omisión, los cuales son imprescindibles en este ámbito. Los ensayos de omisión consisten en ir eliminando uno a uno los distintos componentes de una mezcla (la cual se elabora con los compuestos determinados en la caracterización del aroma en las mismas concentraciones en las que estén en la muestra) con el objetivo de determinar cuál es el efecto sensorial que la eliminación de un componente tiene sobre el aroma global. Sin embargo, en mezclas aromáticas complejas como las bebidas alcohólicas, la eliminación de uno de sus componentes no suele ejercer un efecto significativo sobre el aroma global. Ello ocurre porque son varios los componentes que, de manera aditiva, sinérgica o antagonista, actúan sobre cada descriptor aromático, de forma que la eliminación de uno de ellos causa un efecto pobre, difícilmente reconocible y evaluable [67].

### 4.3. Determinación de off-flavours

Para la aceptación de una bebida alcohólica y, en general de cualquier sustancia que tenga olor, tan importante es la presencia de aromas característicos del producto en cuestión como la ausencia de olores anómalos. La terminología inglesa denomina a estos olores que no se asocian al producto en el que se encuentran off-flavours. A grandes rasgos puede decirse que los olores extraños provienen de la pérdida de un compuesto con carácter impacto, de un cambio en la concentración de una o más sustancias, o bien de la modificación de la composición de los componentes individuales del aroma, ya sea a partir de los productos naturales, ya sea por contaminación [1].

Dado el impacto que estos compuestos pueden tener sobre el aroma final, no es de extrañar que varios investigadores hayan focalizado la investigación hacia su determinación. De esta manera, en estudios relacionados con el vino utilizando la técnica de la GCO se ha identificado y cuantificado la geosmina como un compuesto con olor a tierra que contamina los vinos [68], se han caracterizado algunos compuestos con olor a setas y tierra en uvas [69], y también se ha identificado una pirazina como responsable de olores a moho en tapones de vino [70]. En el campo de la cerveza también se ha aplicado con éxito la técnica de la GCO para llevar a cabo el estudio de distintos off-flavours [71-73], algunos de los cuales relacionados con olores a moho [74]. En este estudio también se proponen algunas medidas para prevenir la presencia de los compuestos estudiados (geosmina, metilisoborneol, pirazinas y cloroanisoles). Cabe destacar que, como ya se ha dicho, la procedencia de estos off-flavors no siempre es conocida, por lo que algunos trabajos sobre cerveza se centran sobretudo en los factores responsables de la aparición de estos off-flavours, como puede ser la exposición a la luz [44].

### 4.4. Correlación entre GCO y evaluaciones sensoriales convencionales

Otro campo de estudio muy interesante para las bebidas espirituosas es el que tiene como objetivo principal el llegar a correlacionar los resultados obtenidos mediante la GCO con los resultados de los análisis sensoriales convencionales. Así por ejemplo, encontramos trabajos que consiguen una correlación –en unos casos mejor que en otros- utilizando como método de análisis sensorial un simple test triangular (en este test los catadores deben encontrar cuál de las tres muestras que se les da es distinta a las otras dos) [57, 75-77]. Otros autores comparan los resultados utilizando un método dúo-trío [78] y hay algunos trabajos en los que se correlacionan los resultados de la GCO con los de un simple análisis sensorial descriptivo de la muestra analizada [57].



No obstante, cuando se trabaja con muestras aromáticamente complejas como es el caso de las bebidas alcohólicas, muchas veces estas correlaciones no resultan tan obvias, por lo que hay que recurrir a técnicas quimiométricas adecuadas. Es el caso de un estudio con vinos españoles realizado por Campo y colaboradores [75] en el que utilizan el método de mínimos cuadrados, al igual que otro trabajo con vinos californianos de la variedad Chardonnay de Lee y colaboradores [47]. Por otro lado, Fur y colaboradores llevaron a cabo un estudio muy exhaustivo de la relación entre el análisis sensorial y los resultados de la GCO de seis vinos utilizando para ello análisis de proclústeres generalizados [79].

#### 4.5. Control de calidad

De manera general, podemos afirmar que las bebidas alcohólicas son un producto que, por sus características, basan gran parte de su valor añadido en la calidad organoléptica y, por lo tanto, en su aroma. Además, en última instancia, y a diferencia de otros alimentos que tienen más propiedades nutritivas, las bebidas alcohólicas tienen que complacer mayoritariamente a los sentidos, ya que su objetivo principal es proporcionar satisfacción al consumidor, por lo que su nivel de calidad estará determinado por su degustación. Por ello, no es de extrañar que el análisis sensorial, y también la GCO, participen con peso específico en el control de calidad de estos productos.

Como en cualquier otro campo, para obtener un producto de calidad es necesario un control de todo el proceso desde la entrada de la materia prima hasta la salida del producto final. Así por ejemplo, es importante que las frutas, bayas, granos, etc. utilizados en la producción de las distintas bebidas alcohólicas no presenten ningún tipo de defecto, como puede ser podredumbre o moho, puesto que esto se podría traducir en la generación de metabolitos indeseados que, en algunos casos, podrían dar lugar a compuestos con aromas indeseables con límites de detección muy bajos [15, 68]. La posibilidad que ofrece la GCO de identificar este tipo de compuestos, tanto en la materia prima como durante la fermentación, resulta de gran interés para la industria de este campo. Por otro lado, existen también estudios que utilizan la GCO para estudiar la formación del aroma de distintas bebidas bajo la influencia de algún factor como, por ejemplo, el pH [80], el tiempo [54, 80] o la luz [44].

Otro parámetro aromático que tiene gran interés en el control de calidad de las bebidas alcohólicas es el seguimiento de algún compuesto aromático que aumente o disminuya su concentración cuando la calidad organoléptica de la bebida en cuestión se ve degradada. A título de ejemplo, la determinación del incremento del contenido en aldehídos como el metional durante el

almacenamiento de la cerveza puede ser un indicador del envejecimiento, pero también de la disminución de sus propiedades organolépticas [81]. De manera similar, un seguimiento de la formación de dicarbonilos puede ayudar a determinar si las condiciones de almacenamiento son las adecuadas [82], del mismo modo que la intensidad del olor del trisulfuro de dimetilo es un indicador del estado de madurez de la misma [80].

Un campo interesante que se ha abierto recientemente dentro del control de calidad utilizando la GCO es la identificación de los compuestos responsables de que el aroma perdure más tiempo en boca (aftertaste). Con este objetivo se desarrolló la técnica Bucal Odour Screening System (BOSS), la cual utiliza la Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) como técnica para extraer el aroma que queda en boca una vez se ha ingerido la muestra. Esta técnica se ha aplicado con éxito en la determinación de los compuestos responsables del aftertaste de un vino Chardonnay [83].

Para concluir, y considerando los buenos resultados que se han obtenido hasta el momento, pero teniendo en cuenta también las muchas incógnitas que quedan por resolver en el campo del análisis del aroma de las bebidas alcohólicas, hay que decir que la aplicación de la técnica de la GCO en este ámbito sigue siendo de gran interés. Por ello, algunos de los últimos estudios van dirigidos hacia la mejora de la técnica, ya sea utilizando diferentes puertos olfativos, aumentando su sensibilidad, incrementando su repetitividad, etc. Parte de esta mejora está directamente relacionada con la obtención de extractos más representativos, empleando técnicas que requieran poca manipulación de la muestra, aunque tampoco se puede olvidar que también es necesario seguir investigando para mejorar las técnicas de cuantificación utilizadas en la GCO.

**Tabla 3.** Aplicaciones de la técnica de la GCO al aroma de distintas bebidas alcohólicas

Nº	Año	Bebida Alcohólica	Tipo de estudio	Técnica de Extracción	Técnica Olfatimétrica	Referencia Bibliográfica
1	1991	Cerveza	Caracterización del aroma	Extracción con diclorometano	AEDA	Schieberle [43]
2	1991	Cerveza	Off-flavors	Extracción con diclorometano	AEDA	Schieberle [72]
3	1996	Tequila	Caracterización del aroma	Extracción con diclorometano	AEDA	Benn [53]
4	1998	Vino	Determinación de compuestos azufrados con carácter impacto	Extracción sobre pHMB	Frecuencia de detección	Bouchilloux [65]
5	2000	Vinos tintos jóvenes	Determinación de la base aromática de los vinos tintos jóvenes	Desmiliturización y posterior extracción con Freón 113	AEDA	Ferreira [45]
6	2000	Champagne	Caracterización del aroma	Desmiliturización y posterior extracción con Freón 113	AEDA	Escudero [55]
7	2001	Cerveza	Determinación de los aromas procedentes del lúpulo	SPE	AEDA	Lermusseau [77]
8	2001	Scotch Whisky	Determinación de algunos compuestos impacto	SPME	Tiempo-intensidad	Connor [51]
9	2001	Tequila	Determinación de compuestos impacto en tequilas con distintos tiempos de permanencia en barril	Extracción con diclorometano	CHARM	López [54]
10	2001	Vino Rioja	Determinación de compuestos clave en vino de la D.O. Rioja	SPE	AEDA	Aznar [62]
11	2002	Brotos de bambú fermentados	Determinación de compuestos aromáticamente activos	SPME	OSME	Fu [58]
12	2002	Coñac	Caracterización del aroma del coñac joven	Extracción con iso-octano	NIF	Lablanque [84]
13	2002	Vino Garnacha	Caracterización del aroma del vino Garnacha	SPE	AEDA	Ferreira [46]
14	2002	Whisky	Determinación de los compuestos responsables de la nota verde en whiskys	Extracción con diclorometano	Frecuencia de detección	Wanikawa [85]
15	2003	Vino	Caracterización del aroma de vinos californianos	Extracción con Freón 113	Frecuencia de detección	Lee [47]
16	2003	Cerveza	Aroma de lúpulo en cerveza	Extracción con Freón 113	CHARM	Murakami [73]
17	2003	Cerveza	Aroma de cerveza envejecida	SPME	CHARM	Murakami [73]
18	2003	Vino Garnacha	Caracterización del aroma	SPME	AEDA	Marti [27]
19	2003	Calvados	Caracterización del aroma	Extracción con pentano	AEDA	Guichard [87]
20	2004	Vino	Caracterización del aroma de vinos de calidad	SPE	AEDA	Cullere [48]
21	2004	Coñac	Determinación de compuestos clave del aroma	Extracción con diclorometano	Tiempo-intensidad NIF	Ferrari [63]

22	2004	Cerveza	Determinación de metional y fenilacetaldéhidido como indicadores de la estabilidad del aroma de cervezas	Extracción con diclorometano	Frecuencia de detección	Soares da Costa [81]
23	2005	Licor chino Yanghe Daqu	Caracterización del aroma	SPME	AEDA	Fan [59]
24	2005	Sake	Estudio de la evolución del aroma durante el envejecimiento	SBSE	AEDA	Isogai [92]
25	2005	Cerveza Pilsner	Determinación de los compuestos impacto	Extracción con diclorometano	AEDA	Fritsch [22]
26	2005	Vino Pinot Noir	Caracterización del aroma	Extracción con diclorometano	AEDA	Fang [49]
27	2005	Cerveza	Efecto del pH y el tiempo en el aroma de la cerveza	Extracción con diclorometano	AEDA	Guyot-Declerck [80]
28	2006	Cerveza	Comparación del aroma de cervezas con y sin lúpulo	Extracción con diclorometano	CHARM	Kishimoto [61]
29	2006	Vino	Caracterización de Vino Sauternes	SPE	AEDA	Bailly [50]
30	2006	Zumo de anacardos fermentado	Determinación de los compuestos impacto del aroma	Purga y trampa	OSME	Garruti [32]
31	2006	Vino Merlot y Vino Cabernet Sauvignon	Comparación de los aromas	SPME	Tiempo-intensidad	Gürbüz [88]
32	2006	Vino de palma	Caracterización de los compuestos impacto	Extracción con diclorometano	AEDA	Lasekan [90]
33	2006	Ron	Caracterización del aroma	Extracción con Freón 113	CHARM	Souza [57]
34	2007	Vino	Identificación de sulfanil alcoholes con carácter impacto	Extracción sobre pHMB	Frecuencia de detección	Sarrazin [86]
35	2008	Vinos postre y cava	Caracterización del aroma	Purga y trampa	Mezcla de frecuencia e intensidad	Campo [56]
36	2008	Vino de naranja	Caracterización del aroma	Extracción con diclorometano	Tiempo-intensidad	Selli [89]
37	2008	Bourbon Whisky	Determinación de compuestos impacto	Extracción con diclorometano	AEDA	Poisson [52]
38	2000	Brandy (distintas variedades de <i>Vitis vinifera</i> )	Comparación del aroma	SPME y extracción con Freón 113	Tiempo-intensidad	Ebeler [91]
39	2008	Cerveza Pilsner	Formación de dicarbonilos aromáticos durante el almacenamiento	SPME	Tiempo-intensidad	Bravo [82]

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] H.D. Beliz, W. Grosch. En *Química de los alimentos, 2ª edición*, Cap. V. Ed. Acribia S.A., Zaragoza (1997)
- [2] C. Fisher, T.R. Scott. En *Flavores de los alimentos. Biología y Química*, Cap. I-II. Ed. Acribia S.A., Zaragoza (2000)
- [3] C.M. Delahunty, G. Eyres, J.P. Dufour. *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 2107-2125
- [4] Gail, V.C.; Brenda, G.L (2001). En *Aroma & Flavour Lexicon for Sensory Evaluation*. ASTM DS 66
- [5] A.C. Noble, R.A. Arnold, B.M. Masuda, S.D. Pecore, J.O. Schmidt, P.M. Stern. *Am. J. Enol. Vitic.*, 35 (2) (1984) 107-109
- [6] C. Meilgaard, D. S. Reid, and K. A. Wyborski. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 40 (1982) 119-128
- [7] F. Sauvageot. En *Les arômes alimentaires*, Cap II. Ed. Lavoisier, Tec & Doc. Paris (1992)
- [8] M. Rychlik, P. Schieberle, W. Grosch. En *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München (1998)
- [9] H. Maarse. En *Volatile compounds in food and beverages*. H. Maarse (ed), TNO-CIVO Food Analysis Institute, Marcel Dekker, Inc. New York (1991)
- [10] H. Guth, W. Grosch. En *Flavor chemistry*. R. Teranishi, Wick EL, I. Hornstein (eds.). Kluwer Academic/Plenum, New York (1999) 377-386
- [11] P. Schieberle, P. Pfner. En *Flavor chemistry*. R. Teranishi, Wick EL, I. Hornstein (eds.). Kluwer Academic/Plenum, New York (1999) 147-153
- [12] S. Le-Guen, C. Prost, M. Demaimay. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (4), (2000) 1307-1314
- [13] A. Hinterholzer, P. Schieberle. *Flav. Frag. J.*, 13 (1) (1998) 49-55
- [14] G.H. Fuller, R. Steltenkamp, G.A. Tisserand. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 116 (1964) 711-724
- [15] B. Plutowska, W. Wardencki. *Food Chem.*, 107 (2008) 449-463
- [16] H. Guth, W. Grosch. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 23 (1990) 513-520
- [17] B.S. Mistry, T. Reineccius, L.K. Olson. En *Techniques for analyzing food aroma*. R. Marsili (ed.). Marcel Dekker Inc., New York (1997) 265-292
- [18] M. Rothe, B. Thomas. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 119 (1963) 302-310
- [19] T.E. Acree, J. Barnard, D.G. Cunningham. *Food Chem.*, 14 (1984) 273-286
- [20] F. Ullrich, W. Grosch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 184 (1987) 277-282
- [21] P. Schieberle, W. Grosch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 185 (1987) 111-113
- [22] H. T. Fritsch, P. Schieberle. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 7544-7551
- [23] I. Blank. En *Techniques for analyzing food aroma*. R. Marsili (ed.). Marcel Dekker Inc., New York (1997) 293-331

- [24] R. Kerscher, W. Grosch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 204 (1997) 3-6
- [25] H. Guth, W. Grosch. *Flavour Fragrance J.*, 8 (1993) 173-178
- [26] K.D. Deibler, L.H. Lavin, T.E. Acree. *J. Agric. Food Chem.*, 4 (1999) 1616-1618
- [27] M.P. Martí, M. Mestres, C. Sala, O. Busto, J. Guasch. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 7861-7865
- [28] W. Grosch. *Flavour Fragrance J.*, 9 (1994) 147-158
- [29] S.M. van Ruth. *Biomolecular Engineering*, 17 (2001) 121-128
- [30] M.R. McDaniel, R. Miranda-López, B.T. Watson, N.J. Micheals, L.M. Libbey. En *Flavors and off-flavors*. G. Charalambous (ed.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1990) 23-36
- [31] M. da Silva, D.S. Lundahl, M.R. McDaniel. En *Trends in Flavour Research*. H. Maarse and D.G. van der Heij (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1994) 191-209
- [32] D. S. Garruti, M.R. Franco, M.A. da Silva, N.S. Janzantti, G. L. Alves. *LWT – Food Sci. Tech.*, 39 (2006) 373-378
- [33] R. Miranda-López, L.M. Libbey, B.T. Watson, M.R. McDaniel. *J. Food Sci.*, 57 (1992) 985-993
- [34] P.X. Etievant, G. Callement, D. Langlois, S. Issanchou, N. Coquibus. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 1673-1680
- [35] H. Guichard, E. Guichard, D. Langlois, S. Issanchou, N. Abbott. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 201 (1995) 344-350
- [36] P.X. Etiévant. En *Analysis of taste and aroma*. J.F. Jackson and H.F. Linskens (eds.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (2002) 223-237
- [37] S.M. van Ruth, C.H. O'Connor. *Food Chem.*, 74 (2001) 341-347
- [38] V. Ferreira, J. Pet'ka, M. Aznar, J. Cacho. *J. Chromatogr. A*, 1002 (2003) 169-178
- [39] J.P.H. Linssen, J.L. Janssens, J.P. Roozen, M.A. Posthumus. *Food Chem.*, 8 (1993) 1-7
- [40] P. Pollien, A. Ott, F. Montigon, M. Baumgartner, R. Muñoz-Box, A. Chaintreau. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 2630-2637
- [41] A. Chaintreau. En *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*. R. Marsili (ed.). Marcel Dekker Inc., New York (2002) 333-348
- [42] P. Pollien, L.B. Fay, M. Baumgartner, A. Chaintreau. *Anal. Chem.*, 71 (1999) 5391-5397
- [43] P. Schieberle. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 193 (1991) 558-565
- [44] D. Komarek, K.Hartmann, P. Schieberle. En *Flavour Research at the Dawn of the Twenty-first Century*. J.L. Le Quére and P.X. Étievant (eds.) Tec&Doc Editions. Paris, 2003, 650-653
- [45] V. Ferreira, R. López, J. Cacho. *J. Sci. Food Agric.*, 80 (2000) 1659-1667
- [46] V. Ferreira, N. Ortín, A. Escudero, J. Cacho. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4048-4054
- [47] S. J. Lee, A. C. Noble. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 8036-8044
- [48] L. Culleré, A. Escudero, J. Cacho, V. Ferreira. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1653-1660
- [49] Y. Fang, M. Qian. *Flavour Fragrance J.*, 20 (2005) 22-29

- [50] S. Bailly, V. Jerkovic, J. Marchand-Brynaert, S. Collin. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 7227-7234
- [51] J. Connor, K. Reid, G. Richardson. En *Gas Chromatography-Olfactometry: The State of the Art*. J.V. Leland and P. Schieberle (eds.) ACS Symposium Series 782. American Chemical Society: Washington DC, 2001, 113-121.
- [52] L. Poisson, P. Schieberle. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 5813-5819
- [53] S. M. Benn, T.L. Peppard. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 557-566
- [54] M. Lopez, J. Dufour. En *Gas Chromatography-Olfactometry: The State of the Art*. J.V. Leland and P. Schieberle (eds.) ACS Symposium Series 782. American Chemical Society: Washington DC, 2001, 62-72.
- [55] A. Escudero, M. Charpentier, P. Etievant. *Sci. Aliment.*, 20 (2000) 331-347
- [56] E. Campo, J. Cacho, V. Ferreira. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 2477-2484
- [57] M.D.C.A. Souza, P. Vasquez, N.L. Mastro, T.E. Acree, E.H. Lavin. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 485-488
- [58] S. Fu, Y. Yoon, R. Bazemore. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 549-554
- [59] W. Fan, M.C. Qian. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 7931-7938
- [60] W. Fan, M.C. Qian. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 2695-2704
- [61] T. Kishimoto, A. Wanicawa, K. Kono, K. Shibata. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 8855-8861
- [62] M. Aznar, R. López, J. Cacho, V. Ferreira. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 2924-2929
- [63] G. Ferrari, O. Lablanquie, R. Cantagrel, J. Ledauphin, T. Payot, N. Fournier, E. Guichard. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5670-5676
- [64] C. Vermeulen, S. Bailly, S. Collin. En *Flavour Science. Recent Advances and Trends*. W.L.P. Bredie and M.A. Petersen (eds.) Elsevier B.V., 2006, 245-248
- [65] P. Bouchilloux, P. Darriet, R. Henry, V. Lavigne-Cruège, D. Dubourdieu. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 3095-3099
- [66] T. Tominaga, G. Gimbertau, D. Dubourdieu. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 1016-1020
- [67] W. Grosch. *Chem. Senses*, 26 (2001) 533-545
- [68] P. Darriet, M. Pons, S. Lamy, D. Dubourdieu. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4835-4838
- [69] S. La Guerche, B. Dauphin, M. Pons, D. Blancard, P. Darriet. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 9193-9200
- [70] R.F. Simpson, D.L. Capone, M.A. Sefton. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5425-5430
- [71] S. Sakuma, H. Amano, M. Ohkochi. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 58 (2000) 26-29
- [72] P. Schieberle. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 193 (1991) 558-565
- [73] A.A. Murakami, H. Goldstein, A. Navarro, J.R. Seabrooks, D.S. Ryder. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 61 (2003) 23-32
- [74] M.J. McGarrity, C. McRoberts, M. Fitzpatrick. *MBAA TQ*, 40 (2003) 44-47

- [75] E. Campo, V. Ferreira, A. Escudero, J. Cacho. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 5682-5690
- [76] Y. Kotseridis, A. Razungles, A. Bertrand, R. Baumes. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 5383-5388
- [77] G. Lermusieau, M. Bulens, S. Collin. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 3867-3874
- [78] A. Escudero, B. Gogorza, M.A. Melus, N. Ortín, J. Cacho, V. Ferreira. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 3516-3524
- [79] Y. Fur, V. Mercurio, L. Moio, J. Blanquet, J.M. Meunier. *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 443-452
- [80] C. Guyot-Declerck, N. François, C. Ritter, B. Govaerts, S. Collin. *Food quality and preference*, 16 (2005) 157-162
- [81] M. Soares da Costa, C. Gonçalves, A. Ferreira, C. Ibsen, P. Guedes de Pinho, A. C. Silva. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 7911-7917
- [82] A. Bravo, J. Herrera, E. Scherer, Y. Ju-Nam, H. Rübsam, J. Madrid, C. Zufall, R. Rangel-Aldao. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 4134-4144
- [83] A. Buettner. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 2339-2346
- [84] O. Lablanquie, G. Snackers, R. Cantagrel, G. Ferrari. *Anal. Chim. Acta.*, 458 (2002), 191-196
- [85] A. Wanikawa, K. Hosoi, T. Kato, K. Nakagawa. *Flav. Frag. J.*, 17 (2002) 207-211
- [86] E. Sarrazin, S. Shinkaruk, T. Tominaga, B. Bennetau, E. Frérot, D. Dubourdieu. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 1437-1444
- [87] H. Guichard, S. Lemesle, J. Ledauphin, D. Barillier, B. Picoche. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003), 424-432
- [88] O. Gürbüz, J.M. Rouseff, R.L. Rouseff. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 3990-3996
- [89] S. Selli, A. Canbas, V. Varlet, H. Kelebek, C. Prost, T. Serot. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 227-234
- [90] O. Lasekan, A. Buettner, M. Christbauer. *Food Chem.*, 105 (2006) 15-23
- [91] S. Ebeler, M. Terrien, C. Butzke. *J. Sci. Food Agric.*, 80 (2000) 625-630
- [92] A. Isogai, H. Utsunomiya, R. Kanda, H. Iwata. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 4118-4123



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## CAPÍTULO 4

El vinagre de vino con  
DOP "Vinagre de Jerez"



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## 4.1.- EL VINAGRE

Desde la antigüedad, el vinagre aparece en casi todas las culturas, independientemente de la época y zona geográfica donde éstas se desarrollaran, bien como condimento, conservador de alimentos o ingrediente de los mismos, como bebida, como desinfectante o como base de remedios sencillos frente a diversas enfermedades [1]. Y aunque la palabra "vinagre" deriva etimológicamente del latín "*vinum acre*", y más concretamente de la locución francesa "*vin aigre*" o vino agrio, su origen no debe circunscribirse exclusivamente al vino, dado que puede obtenerse a partir de cualquier sustrato amiláceo susceptible de ser fermentado [2].

### 4.1.1.- Definición

Según la FAO/OMS (*Codex Alimentarius*, 1985), el vinagre es un líquido apto para el consumo humano, que se obtiene de forma exclusiva a partir de materias primas de origen agrícola que contengan almidones y/o azúcares, por un doble proceso de fermentación, alcohólica y acética. Debe contener cantidades determinadas de ácido acético y puede presentar otros ingredientes adicionales (hierbas, especias, sal), lo que será regulado por la Comisión del *Codex Alimentarius*. Estos ingredientes opcionales se añaden con objeto de obtener un aroma peculiar y característico de cada tipo de vinagre.

De acuerdo con la Reglamentación Técnico-Sanitaria española [3], la denominación genérica de "vinagre" define al líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario que contengan azúcares o sustancias amiláceas. Los vinagres deberán presentar un valor de acidez total, expresado en gramos de ácido acético por 100 mL a 20 °C, no inferior a 50 g/L, excepto para el vinagre de vino, que deberá ser, al menos, de 60 g/L. Esta reglamentación excluye los vinagres de vino que se amparen en denominaciones de origen, específicas o de calidad reconocidas, que se registrarán por su normativa específica, cualquiera que sea su ámbito.

### 4.1.2.- Tipos de vinagre

Puesto que prácticamente cualquier sustrato que presente carbohidratos fermentables puede convertirse en vinagre y que el proceso de fermentación alcohólica y posterior acetificación ha sido llevado a cabo por muy distintas civilizaciones a lo largo de los siglos, existe una gran variedad de vinagres. Por este motivo, los vinagres pueden clasificarse en función de la materia prima o del proceso de elaboración empleados [2, 4, 5].

En aquellos países sin tradición enológica o donde el cultivo de la vid es difícil o minoritario, los vinagres mayoritarios son los vinagres de frutas (dátiles, piña, coco, ciruelas, etc.), de sidra (con larga tradición en el Reino Unido y Estados Unidos), de malta, de cereales o de melazas, así como los vinagres de arroz y sake (ampliamente extendidos en China y Japón) y el vinagre de alcohol. Este último se elabora a partir de la fermentación acética de una disolución acuosa de etanol, el cual debe proceder de la fermentación alcohólica de materias agrícolas, seguida de destilación. Sin embargo, el vinagre que en Estados Unidos se conoce como "*white distilled vinegar*", se elabora a partir de cualquier alcohol, incluso el sintético, aunque previamente desnaturalizado (generalmente con acetato de etilo).

Excepciones a estos vinagres de origen agrícola son el vinagre de suero de leche, el vinagre de miel y el vinagre sintético o artificial. El primero emplea el suero residual obtenido tras la elaboración del queso, y que debe ser pasteurizado antes de las fermentaciones alcohólica y acética por su alta contaminación con bacterias ácido lácticas. El segundo se obtiene a partir de la miel diluida, la cual es sumamente rica en azúcares. Por su parte, el vinagre sintético se elabora con una disolución acuosa diluida de ácido acético no biogénico (obtenido a partir del acetileno o del ácido pireleñoso de la madera) a la que se añaden aromatizantes (vinagre vínico, destilado de vinos fermentados).

Hasta 1993, la legislación alimentaria española [3] no contemplaba ninguno de los vinagres anteriormente descritos, ya que, según la reglamentación vigente hasta entonces [6], el término "vinagre", sin más calificativo, era sinónimo de "vinagre vínico", el único que estaba autorizado.

Hoy en día, en España y el resto de países vinícolas, la materia prima más comúnmente utilizada en la elaboración de vinagre es la uva, definiéndose el vinagre de vino como el producto obtenido exclusivamente por fermentación acética del vino. De tal manera que, cuando se habla de "vinagre", se hace referencia al "vinagre de vino".

#### **4.1.3.- Métodos de elaboración del vinagre de vino**

En el proceso de obtención del vinagre se produce una primera fermentación alcohólica por parte de las levaduras vínicas, las cuales transforman los azúcares de las uvas en etanol. Posteriormente, se produce una fermentación acética de dicho alcohol por las bacterias acéticas, la cual genera el ácido acético característico del producto final.

Pero mucho antes de que se tuviera conocimiento de los microorganismos que participan en el proceso fermentativo, el hombre ya conocía y empleaba el vinagre. De hecho, existen referencias a la obtención del vinagre de dátiles en la cultura babilónica (5000 años antes de Cristo) [7]. Los métodos de elaboración empleados en la antigüedad eran empíricos, artesanales y fundamentalmente familiares, y consistían en permitir el lento contacto de un sustrato alcohólico con el aire. En el caso del vinagre de vino, básicamente consistían en dejar los residuos de un buen vino en un tonel de madera durante bastante tiempo, en presencia de la vieja madre del vinagre (restos de vinagres anteriores).

Hoy en día, desde el punto de vista tecnológico, existen dos métodos claramente diferenciados a la hora de producir vinagre: los métodos de acetificación con cultivo

sumergido (rápidos) y los métodos tradicionales de acetificación con cultivo superficial (lentos) [2, 7, 8].

#### **4.1.3.1.- Métodos de acetificación con cultivo sumergido o métodos rápidos**

Estos métodos se caracterizan por la presencia de un cultivo de bacterias acéticas sumergido en el seno del líquido a fermentar, sin la presencia de ningún material poroso o soporte, y por la introducción constante de pequeñas burbujas de aire (solo o enriquecido con oxígeno) a través de la biomasa [9, 10].

En ellos, el proceso de la acetificación es muy rápido (25-30 horas) y los rendimientos de la transformación del alcohol en ácido acético son muy elevados (entre 95-98%), gracias a la mayor población bacteriana que se logra por la gran disponibilidad de oxígeno existente. Para llevarlos a cabo se necesitan acetificadores, toneles de acero inoxidable que cuentan con una turbina de aireación e intercambiadores de calor, dado que el proceso de acetificación es muy exotérmico. De esta manera puede controlarse la temperatura entorno a los 30 °C, el valor óptimo de desarrollo de las bacterias acéticas [10, 11]. Como punto final a la producción, el vinagre obtenido por métodos rápidos debe someterse a diversos tratamientos tecnológicos, como la clarificación y el filtrado, para conseguir una mayor estabilidad y una adecuada salubridad del producto [2, 10, 11].

El principal problema que presentan los métodos de acetificación rápidos es la pérdida de componentes volátiles por el suministro continuo de aire, pero cuya carencia puede paralizar la acetificación dado el carácter aerobio de las bacterias acéticas [12]. Por este motivo se han llegado a proponer fermentadores cerrados con sistemas de recirculación de aire [13].

Gracias a estos métodos de producción se logra una gran uniformidad del producto, así como una acetificación de grandes volúmenes de alcohol en muy poco tiempo y ocupando pequeños volúmenes de instalación. De igual modo, estos métodos permiten trabajar con dispositivos automáticos que regulan el control de la

aireación (presión parcial de oxígeno), la temperatura y los ciclos de carga y descarga. De manera que es así como se obtienen de forma rápida los vinagres comerciales actuales (de menor precio) que, después, pueden envejecerse o no en madera.

#### **4.1.3.2.- Métodos de acetificación con cultivo superficial o métodos lentos**

En estos métodos, las bacterias acéticas se encuentran en contacto directo con el oxígeno del aire, bien porque están situadas en la interfase líquido/gas o bien porque están fijadas a soportes materiales como virutas. En cualquier caso, el proceso de acetificación es lento, dada la limitada disponibilidad de oxígeno, lo que permite un envejecimiento simultáneo.

Uno de estos métodos, y de los más antiguos en la elaboración de vinagres, es el *método de Orleans*. Emplea toneles de 200-400 L de capacidad, colocados tumbados en filas horizontales y superpuestas. En los extremos de los fondos de cada barril, y por encima del centro del mismo, hay dos agujeros de unos 5 cm que se rellenan con estopa. Estos permiten el paso del aire, pero no la entrada de las moscas del vinagre. El lateral superior presenta otro orificio que se tapa con un tapón de corcho y por donde penetra un tubo de vidrio recto que casi llega hasta el fondo del líquido. Así se puede renovar el sustrato sin alterar el velo bacteriano situado en la superficie. Se trata de un procedimiento estático, donde el líquido a acetificar es una mezcla de vino de bajo grado alcohólico con un 20% de vinagre turbio [7].

Otro de estos métodos es el *método luxemburgués o proceso Michaelis*. En él se emplea una cuba o tonel giratorio, colocado sobre un caballete. En el interior del tonel hay un falso fondo con numerosos y pequeños agujeros, y la parte menor está rellena con virutas de madera. Dicho tonel también cuenta con un orificio estrecho en uno de sus costados, obturado con un tapón, y que sirve para su vaciado. Tras introducir el vino en la barrica, ésta se va girando periódicamente hasta que la acetificación se completa, momento en el que el vinagre elaborado se sustituye por porciones iguales de vino [2].



El *método de Schützenbach* también es un método lento, y en él se emplean toneles o generadores verticales de madera de encina con un doble fondo. Sobre el primer fondo, que está agujereado, se colocan varias capas de virutas de madera, de encina o de haya, impregnadas de vinagre de buena calidad. Sobre el borde superior del tonel o generador hay un diafragma perforado, con los orificios obturados con algodón, por el que percola el vino desde la parte superior a la inferior a intervalos regulares. De esta manera, el vino se pone en contacto íntimo con las virutas de madera a la vez que burbujea el aire que existe entre ellas, mientras que el vinagre obtenido se extrae por la parte inferior. El sistema se continúa hasta la transformación completa del vino en vinagre, volviendo a reconducir el vino en fase de acetificación desde la parte inferior hasta la superior mediante un bombeo adecuado [2].

Por último, cabe destacar dos métodos de acetificación lentos responsables de la obtención de dos vinagres artesanales de gran calidad y reconocimiento internacional, que además cuentan con la distinción de “Denominación de Origen Protegida” por parte de la Unión Europea: el “Vinagre Balsámico Tradicional” [14] y el “Vinagre de Jerez” [15].

El “Vinagre Balsámico Tradicional” (VBT) se produce en las regiones italianas de Modena y Reggio Emilia a partir de mosto de uva. Dicho mosto se cuece a presión atmosférica por exposición directa al calor hasta que se alcanza una reducción de volumen del 20-30% [5, 16]. En este primer paso tienen lugar las reacciones de Maillard entre los aminoácidos y los azúcares reductores que serán las responsables de la caramelización y la formación de numerosos compuestos con gran impacto en el color y el aroma del producto final [17]. Tras una fermentación alcohólica parcial, el líquido se traspasa a un conjunto de barricas, normalmente entre 5 y 7, de diferentes maderas y tamaño decreciente. Cada año se saca un pequeño volumen de la barrica más pequeña, que se rellena con el vinagre de la barrica inmediatamente mayor [18]. Este procedimiento, denominado “*rincalzo*”, se lleva a cabo con cada barrica, de manera que la última y más grande es la que recibe el nuevo mosto cocinado en

sustitución del vinagre retirado. De esta forma, cada barrica contiene una mezcla de vinagres de distintos años. La edad del producto se incrementa al disminuir el tamaño de la barrica.

Para que el VBT pueda ser legalmente considerado como tal, debe presentar un envejecimiento mínimo de 12 años (entonces es etiquetado como "*Affinato*"). Si el envejecimiento llega a los 25, entonces puede etiquetarse como "*Stravecchio*". En cualquier caso, la característica principal de este producto es el equilibrio que se logra entre el ácido acético típico de cualquier vinagre, que proporciona la sensación punzante, y las notas dulces que aporta el mosto inicial no fermentado.

En cuanto al "Vinagre de Jerez", su elaboración, características y atributos se describen con más detalle en los siguientes apartados, al haber sido este producto objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

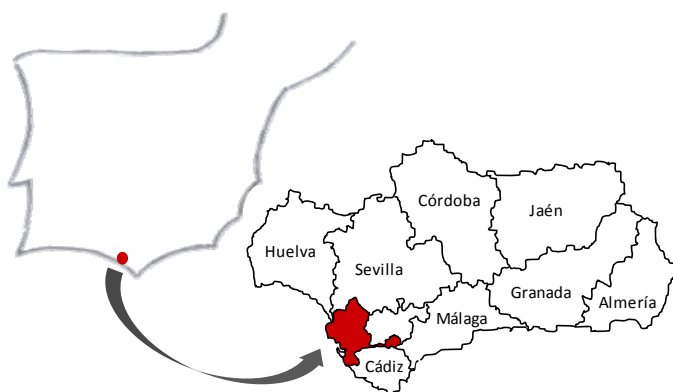
## 4.2.- EL VINAGRE DE JEREZ

Según Estrabón, un geógrafo griego del siglo I a. C., los fenicios cultivaban viñas en la zona de Jerez ya en el año 1100 a. C., distribuyéndose sus vinos por todo el Mediterráneo [19]. Dado el carácter espontáneo del proceso de acetificación, puede asegurarse que el Vinagre de Jerez ya existía por aquel entonces, aunque no fue hasta el siglo I d. C. cuando Columela, un agrónomo nacido en Cádiz [7], dejó constancia escrita de la existencia de este producto por primera vez.

Las condiciones climatológicas de la zona, junto a determinados elementos de la elaboración y crianza tradicionales del vino de Jerez, provocaron el que, en muchas ocasiones, se elevara la acidez volátil de las partidas de vino de forma espontánea. Es decir, por acción de las bacterias acéticas, los vinos acababan convirtiéndose en vinagres. Para no estropear el resto de la producción, estos vinos "picados" se aislaban en bodegas independientes, donde eran sometidos al mismo sistema de

envejecimiento que los vinos. Las particularidades de este método, junto con el tipo de barricas empleadas y el microclima de las bodegas, daban lugar a una serie de transformaciones en los vinagres que les conferían unas características organolépticas especiales. De este modo surgieron unos vinagres de gran calidad que empezaron a comercializarse bajo la Denominación de Origen (DO) “Vinagre de Jerez” a partir de la aprobación de su primer reglamento en 1995 [20]. Desde el año 2000, el patrimonio y las funciones de su Consejo Regulador pasaron a integrarse en el de las DD.OO. “Jerez-Xérès-Sherry”, “Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda” y “Vinagre de Jerez” [21]. Y en 2009 se ha concedido la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida (DOP) “Vinagre de Jerez” [15].

El comúnmente denominado *Marco de Jerez* (**Figura 4.1**) comprende la zona de producción de las mencionadas DD.OO. “Jerez-Xérès-Sherry”, “Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda” y “Vinagre de Jerez”, extendiéndose por ocho municipios de la provincia de Cádiz (Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María, Sanlúcar de Barrameda, Chiclana, Chipiona, Puerto Real, Rota y Trebujena), así como un municipio de la provincia de Sevilla (Lebrija). En cuanto a la zona de crianza, ésta está restringida a Jerez de la Frontera, Sanlúcar de Barrameda y El Puerto de Santa María.



**Figura 4.1.** Situación geográfica del *Marco de Jerez*

Solamente las bodegas de estos municipios podrán realizar el envejecimiento y la posterior expedición de los vinagres amparados por la DOP “Vinagre de Jerez”, los

cuáles serán los únicos que podrán (y deberán) llevar la etiqueta de la denominación de origen para garantizar su origen (**Figura 4.2**).



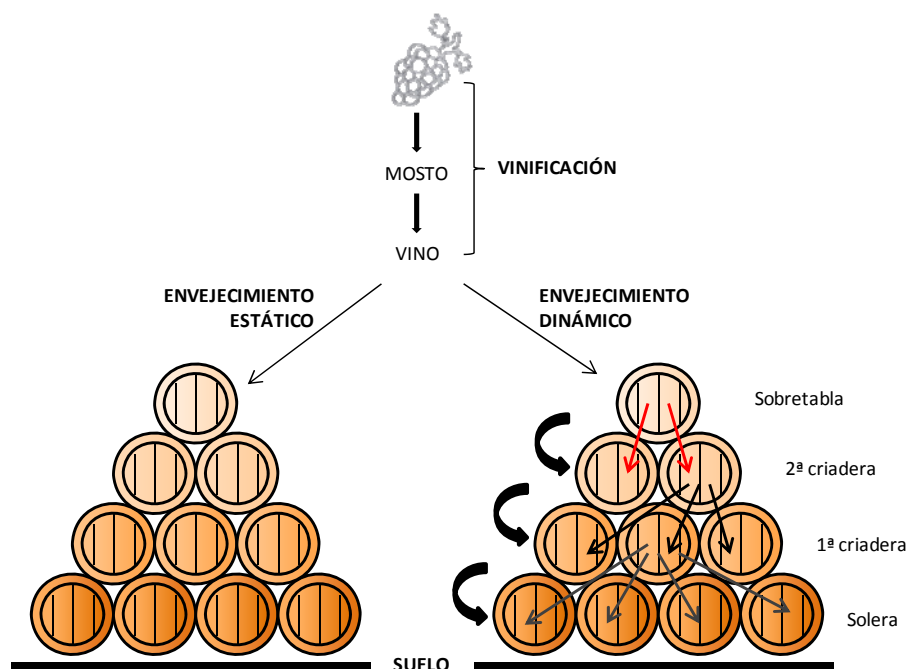
**Figura 4.2.** Etiqueta de la Denominación de Origen "Vinagre de Jerez"

En cuanto a las variedades de uva autorizadas para el elaborar el Vinagre de Jerez, son todas variedades blancas: *Palomino de Jerez*, *Palomino Fino*, *Moscatel* y *Pedro Ximénez*, siendo la primera mayoritaria en cuanto a producción.

De forma general, el Vinagre de Jerez se obtiene a partir de vinos de Jerez que sufren una acetificación. Esta acetificación puede ser por cultivo superficial en barricas de madera (método de Orleans) o por cultivo sumergido, pero siempre seguida de un envejecimiento en botas (barricas) de roble o castaño que previamente hayan contenido vinos de Jerez, lo que se conoce como botas "envinadas". Este envejecimiento obligatorio puede llevarse a cabo por el método estático de la "añada" o por el dinámico de "criaderas y soleras", mucho más extendido [22, 23] (**Figura 4.3**).

En ambos casos se disponen varias filas (entre 3 y 8) de botas superpuestas con capacidad inferior a 1000 litros, aunque la barrica tradicional para este envejecimiento es la denominada bota jerezana, de 500 litros y roble americano. En el sistema dinámico, la fila más cercana al suelo se denomina "solera" y es la que contiene el vinagre de más edad, mientras que sobre ella se encuentran las "criaderas" en orden creciente hasta llegar a la última fila, que es la denominada "sobretabla" (**Figura 4.3**). De la solera se extrae el producto ya acabado en una

operación denominada “saca”, y de la criadera inmediatamente superior se repone el volumen extraído en lo que se denomina “rocío”, y así sucesivamente hasta llegar a la sobretabla, que es donde se añade el vino o el vinagre más joven. Como el volumen extraído nunca puede superar un tercio del volumen total de la bota y el líquido que se saca de una criadera se reparte entre todas las botas de la escala siguiente, el producto final es una mezcla de diversas campañas, consiguiéndose una calidad homogénea, contrariamente a lo que pasa con el sistema estático (**Figura 4.3**), en el que cada vinagre envejece en una sola barrica.



**Figura 4.3.** Sistema de envejecimiento estático y dinámico del Vinagre de Jerez

El número y la periodicidad de las “sacas” y “rocíos” dependen de las bodegas y hacen que sea difícil determinar con exactitud la edad de un determinado vinagre. Por eso el reglamento distingue tres tipos en función de su envejecimiento [15]:

- “*Vinagre de Jerez*”, con un envejecimiento mínimo de 6 meses
- “*Vinagre de Jerez Reserva*”, a partir de 2 años de envejecimiento

- "Vinagre de Jerez Gran Reserva", con más de 10 años de envejecimiento

Todos ellos deben presentar, como mínimo, una acidez total en acético de 70 g/L (80 g/L para los *Gran Reserva*) y un extracto seco de 1,30 gramos por litro y grado acético (2,3 para los *Gran Reserva*). Al ser productos obtenidos por métodos tradicionales, el reglamento permite un contenido en alcohol residual de hasta el 3% en volumen.

Como resultado de este particular sistema de envejecimiento, son numerosos los fenómenos que tienen lugar durante el prolongado contacto entre el vinagre y la madera de las botas [15, 23]:

- una cesión paulatina de los polifenoles de la madera hacia el vinagre [24], los cuales permiten estabilizar el color a la vez que influyen en el flavor y la astringencia;
- una pérdida de agua a través de los poros de la madera (merma) que provoca una concentración de los distintos compuestos químicos, lo que, a su vez, influye en el aroma e incrementa el extracto seco y las sales minerales y, por tanto, el contenido en cenizas del vinagre;
- diversas reacciones de condensación, de polimerización, de Maillard o de esterificación entre compuestos del sustrato a envejecer y compuestos extraídos de la madera que, por ejemplo, incrementan el número y la concentración de ésteres (en especial del acetato de etilo, con gran influencia en las características sensoriales del vinagre);
- distintas reacciones de oxidación-reducción, responsables de la generación de compuestos como la vainillina y el siringaldehído.

De esta forma, el conjunto de todos estos procesos es el responsable de la gran madurez y complejidad aromática y cromática, características de los vinagres de Jerez.

### **4.3.- EL AROMA DEL VINAGRE DE JEREZ**

Como se ha visto en anteriores capítulos, el aroma de cualquier producto se debe a la existencia de determinados compuestos volátiles, capaces de interactuar con nuestro sistema olfativo, y que tienen su origen, tanto en la materia prima utilizada, como en el proceso de elaboración seguido.

Respecto a los distintos tipos de vinagres, el análisis del aroma comenzó a mediados del siglo pasado, aunque inicialmente se basó únicamente en la determinación individual de ciertos compuestos volátiles (metanol, acetaldehído, acetona o diacetilo, así como distintos ésteres y alcoholes superiores) [2]. Hasta la aparición de la cromatografía de gases no pudo separarse y cuantificarse de forma conjunta la fracción volátil mayoritaria del vinagre. Así, aunque su primera aplicación en 1962 sobre vinagre de malta [25] se limitó a la detección de etanol, posteriormente, esta técnica se utilizó con objetivos más complejos. Entre ellos, comprobar que diversas muestras de vinagre de vino y de frutas contenían distintos acetatos, diacetilo, acetoína y varios alcoholes, mientras que el vinagre destilado solamente contenía acetato de etilo como componente volátil [26]. También se aplicó esta técnica para identificar hasta 25 compuestos volátiles en el espacio de cabeza de diferentes tipos de vinagre (de vino, de sidra, de malta y de alcohol) [27], y para realizar un estudio de la composición volátil en las distintas etapas fermentativas, para lo que se analizó zumo de manzana, sidra fermentada y vinagre de sidra [28]. Ya en 1972 se aplicó por primera vez la cromatografía de gases-espectrometría de masas para identificar los volátiles de distintas muestras de vinagre destilado, de manzana, de malta y de vino tinto [29].

Dado que cada producto presenta una composición volátil única, la fracción volátil de distintos vinagres también ha sido utilizada para diferenciar y clasificar estos productos [30-32]. Esto permite luchar contra los fraudes y asegurar la autenticidad y calidad de los productos.

En cuanto al análisis del aroma del Vinagre de Jerez, hasta 1987 no se llevó a cabo un primer estudio acerca de la fracción volátil de los denominados, por aquel entonces, "vinagres andaluces" [33]. En él se detectaron 15 compuestos volátiles, entre los que se encontraban mayoritariamente el acetato de etilo, el acetato de metilo, el dietilacetil, el metanol y el 3-metil-1-butanol.

Desde aquel momento, se han realizado distintos estudios para intentar identificar los compuestos que constituyen la fracción volátil del Vinagre de Jerez, empleando para ello la cromatografía de gases y diversas técnicas de extracción [34-37]. Dada la importancia que tiene el proceso de envejecimiento que se ha de seguir para obtener este producto, también se ha analizado la evolución del perfil volátil de estos vinagres a lo largo de dicho proceso, tanto si se produce de forma normal [38] como si es acelerado mediante el uso de virutas de madera [39].

Sin embargo, todos los estudios previamente descritos iban encaminados únicamente hacia la identificación de los compuestos volátiles, pero no de los compuestos aromáticamente activos, que son aquéllos que realmente contribuyen al aroma del Vinagre de Jerez, ya que en ninguno de estos trabajos se empleaba la cromatografía de gases-olfatometría (GCO). Precisamente, fue esta ausencia de información sobre el tema fue lo que decidió a nuestro grupo de investigación a iniciar esta línea de estudio. De hecho, hasta el momento de comenzar a trabajar en esta tesis doctoral, únicamente se había utilizado la técnica de la GCO para determinar los compuestos aromáticos más potentes en dos vinagres de vino tinto [40].

De este modo, en el año 2007 se obtuvieron los primeros resultados del análisis del aroma del Vinagre de Jerez mediante la aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría [41]. En este trabajo inicial se proponía una primera jerarquización de la contribución de los odorantes al aroma de este producto, empleándose como técnica de extracción y concentración la microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza. Aunque más tarde se han publicado otros trabajos en los que también se



utiliza la GCO para analizar el aroma del Vinagre de Jerez, las técnicas de extracción, así como las de detección de los odorantes utilizadas, son distintas a las empleadas en nuestras investigaciones [42, 43]. Sin embargo, ha sido en el trabajo que se expone en el artículo que se incluye a continuación, y que ha sido enviado a la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [44] para su publicación, cuando se han conseguido la identificación y cuantificación más exhaustivas de los odorantes del Vinagre de Jerez realizadas hasta el momento. En este estudio se detalla, no sólo el proceso de optimización del método de extracción de los volátiles del Vinagre de Jerez mediante microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza, sino también el análisis de los compuestos aromáticos por cromatografía de gases-olfatometría, su identificación y la cuantificación de los más potentes, junto con el cálculo de sus valores de aroma.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mazza, S., Murooka, Y. "Vinegars through the ages". En: Solieri, L., Giudici, P., editors. *Vinegars of the World*. Milán: Springer; 2009, p. 17-39.
- [2] Guzmán Chozas, M. *El vinagre. Características, atributos y control de calidad*. Madrid: Díaz de Santos; 1998.
- [3] Presidencia del Gobierno (1993). Real Decreto 2070/1993 de 26 de noviembre, Boletín Oficial del Estado núm. 293 de 8 de diciembre, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercialización de los vinagres.
- [4] Solieri, L., Giudici, P. "Vinegars of the world". En: Solieri, L., Giudici, P., editors. *Vinegars of the World*. Milán: Springer; 2009, p. 1-16.
- [5] Llaguno Marchena, C. "Definición y tipos de vinagre". En: Llaguno, C., Polo, M. C., coordinadoras. *El vinagre de vino*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991, p. 133-145.
- [6] Presidencia del Gobierno (1973). Decreto 3024/1973 de 23 de noviembre, Boletín Oficial del Estado de 4 de diciembre, sobre Reglamentación para la elaboración, circulación y comercio del vinagre de vino y de orujo.
- [7] Llaguno Marchena, C. "Antecedentes históricos". En: Llaguno, C., Polo, M. C., coordinadoras. *El vinagre de vino*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991, p. 1-23.
- [8] Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends Food Sci. Technol.* 2002; 13: 12-21.
- [9] Conner, H. A., Allgeier, R. J. Vinegar: its history and development. *Adv. Appl. Microbiol.* 1976; 20: 81-133.
- [10] García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J. E., Bonilla-Venceslada, J. L. "Vinegars engineering". En: Solieri, L., Giudici, P., editors. *Vinegars of the World*. Milán: Springer; 2009, p. 97-120.
- [11] Ormaechea Landa, A. R. "Proceso industrial de elaboración del vinagre". En: Llaguno, C., Polo, M. C., coordinadoras. *El vinagre de vino*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991, p. 49-68.

- [12] Nieto, F. J. "Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética". En: Llaguno, C., Polo, M. C., coordinadoras. *El vinagre de vino*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1991, p. 69-96.
- [13] de Ory, I., Romero, L. E., Cantero, D. Maximum yield acetic acid fermenter. Comparative fed-batch and continuous operation studies at pilot plant scales. *Bioprocess Eng.* 1999; 21: 187-190.
- [14] Council Regulation (EC), No. 813/2000, April 17, 2000, Official Journal L 100, 20/04/2000, pp. 0005-0006.
- [15] Resolución de 24 de marzo de 2009, Boletín Oficial del Estado núm. 90 de 13 de abril, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida "Vinagre de Jerez".
- [16] Zeppa, G., Giordano, V., Gerbi, V., Meglioli, G. Characterization of volatile compounds in three acetification batteries used for the production of "Aceto Balsamico Tradizionale di Reggio Emilia". *Ital. J. Food Sci.* 2002; 14: 247-266.
- [17] Piva, A., di Mattia, C., Neri, L., Dimitri, G., Chiarini, M., Sacchetti, G. Heat-induced chemical, physical and functional changes during grape must cooking. *Food Chem.* 2008; 106: 1057-1065.
- [18] Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L. "Traditional Balsamic Vinegar". En: Solieri, L., Giudici, P., editors. *Vinegars of the World*. Milán: Springer; 2009, p. 157-177.
- [19] Merino Sierra, F. J., Fernández Rebollo, R. M. "Vinagres andaluces con Denominación de Origen". En: García García, I., editor y coordinador. *Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres*. Córdoba: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba; 2006, p. 265-283.
- [20] Consejería de Agricultura y Pesca (1995). Orden de 20 de febrero, Boletín Oficial de la Junta de Andalucía núm. 38 de 9 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen "Vinagre de Jerez" y de su Consejo Regulador.
- [21] Consejería de Agricultura y Pesca (2000). Orden de 22 de febrero, Boletín Oficial de la Junta de Andalucía núm. 33 de 18 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen Vinagre de Jerez.
- [22] Quirós, J. M. Elaboración de vinagre de calidad en Jerez. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino* 1990; 14: 115-123.
- [23] Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., Troncoso, A. M. "Jerez Vinegar". En: Solieri, L., Giudici, P., editors. *Vinegars of the World*. Milán: Springer; 2009, p. 179-195.

- [24] García Parrilla, M. C., Heredia, F. J., Troncoso, A. M. Sherry wine vinegar: phenolic composition changes during aging. *Food Res. Int.* 1999; 32: 433-440.
- [25] Morgantini, M. The use of gas chromatography for the analysis of vinegars. I. Concentration of ethanol. *Boll. Lab. Chim. Prov. (Bologna)* 1962; 13: 117-121.
- [26] Suomalainen, H., Kangasperko, J. Aroma substances of vinegar fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1963; 120: 353-356.
- [27] Aurand, L. W., Singleton, J. A., Bell, T. A., Etchells, J. L. Volatile components in the vapors of natural and distilled vinegars. *J. Food Sci.* 1966; 31: 172-177.
- [28] Kahn, J. H., Nickol, G. B., Conner, H. A. Analysis of vinegar by gas-liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1966; 14: 460-465.
- [29] Kahn, J. H., Nickol, G. B., Conner, H. A. Identification of volatile components in vinegars by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 1972; 20: 214-218.
- [30] Natera, R., Castro, R., García-Moreno, M. V., Hernández, M. J., García-Barroso, C. Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3345-3351.
- [31] Casale, M., Armanino, C., Casolino, C., Cerrato Oliveros, C., Forina, M. A chemometrical approach for vinegar classification by headspace mass spectrometry of volatile compounds. *Food Sci. Technol. Res.* 2006; 12: 223-230.
- [32] Durán Guerrero, E., Castro Mejías, R., Natera Marín, R., Palma Lovillo, M., García Barroso, C. A new FT-IR method combined with multivariate analysis for the classification of vinegars from different raw materials and production processes. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90: 712-718.
- [33] Troncoso González, A. M., Guzmán Chozas, M. Volatile components in Andalusian vinegars. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1987; 185: 130-133.
- [34] Blanch, G. P., Tabera, J., Sanz, J., Herraiz, M., Reglero, G. Volatile composition of vinegars. Simultaneous distillation-extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1992; 40: 1046-1049.
- [35] Natera Marín, R., Castro Mejías, R., García Moreno, M. V., García Rowe, F., García Barroso, C. Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar. Validation study. *J. Chromatogr. A* 2002; 967: 261-267.
- [36] Durán Guerrero, E., Natera Marín, R., Castro Mejías, R., García Barroso, C. Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: validation study and comparison with solid phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 2007; 1167: 18-26.

- [37] Chinnici, F., Durán Guerrero, E., Sonni, F., Natali, N., Natera Marín, R., Riponi, C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) characterization of volatile compounds in quality vinegars with protected European geographical indication. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 4784-4792.
- [38] Morales, M. L., Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C., Casas, J. A., Troncoso, A. M. Evolution of the aroma profile of Sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 3173-3178.
- [39] Morales, M. L., Benitez, B., Troncoso, A. M. Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: evaluation of the wood flavor compounds. *Food Chem.* 2004; 88: 305-315.
- [40] Charles, M., Martin, B., Ginies, C., Etievant, P., Coste, G., Guichard, E. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 70-77.
- [41] Aceña, L. "Estudio olfatométrico del aroma del vinagre con Denominación de Origen Vinagre de Jerez" [Diploma de Estudios Avanzados]. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili; 2007.
- [42] Callejón, R. M., Morales, M. L., Troncoso, A. M., Silva Ferreira, A. C. Targeting key aromatic substances on the typical aroma of Sherry vinegar. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 6631-6639.
- [43] Callejón, R. M., Morales, M. L., Silva Ferreira, A. C., Troncoso, A. M. Defining the typical aroma of Sherry vinegar: sensory and chemical approach. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56: 8086-8095.
- [44] Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., Mestres, M. Chemical characterization of commercial Sherry vinegar aroma by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry. *J. Agric. Food Chem.* 2011 (enviado para su publicación).

*Chemical characterization of commercial Sherry vinegar aroma  
by headspace solid-phase microextraction and  
gas chromatography-olfactometry*

Artículo enviado para su publicación en la revista  
**Journal of Agricultural and Food Chemistry (2011)**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## **Chemical Characterization of Commercial Sherry Vinegar Aroma by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Olfactometry**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres

Research Group of Analytical Chemistry of Wine and Food

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry

Campus Sescelades. Facultat d'Enologia de Tarragona

Universitat Rovira i Virgili. 43007 Tarragona (Spain)

### **ABSTRACT**

The sensorial representativeness of the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) aroma extract from commercial Sherry vinegars has been determined by direct gas chromatography-olfactometry (D-GCO). The extracts obtained under the optimal conditions were used to characterize the aroma of these vinegars by means of GCO and aroma extract dilution analysis (AEDA). Among the 37 different odorants determined, 13 of them were identified for the first time in Sherry vinegars: 2 pyrazines (3-isopropyl-2-methoxypyrazine, 3-isobutyl-2-methoxypyrazine), 2 sulphur compounds (methanethiol, dimethyltrisulphide), 1 insaturated ketone (1-octen-3-one), 1 norisoprenoid ( $\beta$ -damascenone), 1 ester (ethyl trans-cinnamate) and 6 aldehydes (2 and 3-methylbutanal, octanal, nonanal, (E)-2-nonenal and (E,E)-2,4-decadienal). The determination of the odour thresholds in a hydroacetic solution together with the quantitative analysis -which was also performed using the simple and fast SPME technique- allowed obtaining the odour activity values (OAV) of the aromatic compounds found. Thus, a first pattern of their sensory importance on commercial Sherry vinegar aroma was provided.

**KEYWORDS:** Sherry vinegar; key odorants; odour activity values; headspace solid-phase microextraction; gas chromatography-olfactometry



## 1. INTRODUCTION

Mankind have produced vinegars since the early days of agriculture until today, all along the world and different cultures, and they have employed them as food ingredients and preservatives, flavour enhancers and also, as ordinary remedies against illness (1). Vinegars are the result of a two-step fermentation process over almost any fermentable carbohydrate source (fruits, honey, cereals, etc.). Firstly, during alcoholic fermentation, yeasts transform sugars into ethanol which is then converted into acetic acid during the second fermentation by acetic acid bacteria.

One of the most commonly used vinegars in the Mediterranean basin and central Europe is wine vinegar, a grape-derived product which can be produced by two different methods: a quick process involving a submerged culture of acetic acid bacteria and a slow, surface culture one (2). The first method, where the rapid fermentation is forced thanks to a continuous oxygenation, provides most commercial vinegars, while the second process, that requires several months to reach the optimum acetic acid degree, produces traditional and high-quality vinegars.

Vinagre de Jerez or Sherry vinegar with Protected Denomination of Origin (P.D.O.) (3) is one of those traditional and selected vinegars, highly appreciated in gastronomy due to its unique chemical and organoleptic properties. Its fermentation process takes place in wood barrels and, as the acetic acid bacteria grow on the air-liquid interface, the oxygen availability is limited what slows down the whole process. Moreover, the "criaderas y soleras" production system followed (4), which consists on a dynamic ageing, allows acetification and ageing to occur simultaneously, so the product obtained presents a very special chemical composition and a great sensory complexity.

Wine vinegars are mainly employed due to their organoleptic properties and, among them, flavour plays a relevant role as it is closely related to quality. Indeed, it is one of the first attributes perceived by consumers and it will have a great influence on the acceptance or rejection of the product. Wine vinegar aroma, as the characteristic aroma of any food commodity, is due to numerous volatile and heterogeneous chemicals at very different concentrations, ranging from several  $\text{mg L}^{-1}$  to a few  $\text{ng L}^{-1}$  (5). These volatile compounds have been studied and reported by different authors (6, 7), including a first attempt to analyze volatile components in Andalusian vinegars (8). But it has not been since the last decade that Sherry vinegar volatiles have been thoroughly analyzed (9-13).

However, although all the odorants must be volatile to reach the nostrils and interact with the appropriate receptors located on the olfactory epithelium (14), not all the volatiles are odour-active. To determine these compounds among the whole volatile fraction of complex mixtures such as foods, gas chromatography-olfactometry (GCO) is the most appropriate analytical tool, as it provides

instrumental and sensory analysis simultaneously (15, 16). Thanks to GCO, the eluted analytes are perceived at the same time by the human nose and a conventional detector, like the Flame Ionic Detector (FID) or the Mass Spectra Detector (MSD), which turns this technique into a powerful one in food aroma characterization.

This technique is the one used by the few researchers that have focused their attention on the compounds that really contribute to wine vinegar aroma. Thus, Charles *et al.* (17) carried out a first determination of the odour-active compounds in two red wine vinegars by GCO based on detection frequency. Some years later, Callejón *et al.* used the GCO technique to screen targeting compounds with an impact on the perceived quality of Sherry vinegars (18) and to identify substances responsible for aromatic notes associated with some selected descriptors of the Sherry vinegar aroma (19). All these studies reported an important number of aromatic components that, in all cases, had been isolated by liquid-liquid (L-L) extraction with dichloromethane. However, in the studies related to Sherry vinegar, the authors did not employ that aromatic extract obtained with L-L extraction to perform the quantification of the aromatic compounds. To achieve this purpose, they used three different techniques to extract and concentrate the aromatic compounds which makes the proposed procedure very laborious, time-consuming, and quite tedious.

Among all the sampling techniques, the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) has shown to be fast and simple because it allows extracting and concentrating the volatiles in a single step with a very little sample handling (20). Moreover, it has also demonstrated to be reliable on the analysis of food aroma compounds (21) as well as on the characterization of the aroma of different commodities when applying an approach to AEDA developed in our laboratory (22, 23).

Therefore, the aim of this study was to characterize the commercial Sherry vinegar aroma by GCO and HS-SPME, with a previous optimization of the HS-SPME conditions to get a representative extract. The approach to the AEDA applied allowed us to obtain a first hierarchical classification of the most potent odorants present in the samples considered. Finally, to confirm the contribution of the most important odorants identified, also their odour activity values (OAV) were calculated.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Samples

Eight commercial Sherry vinegars labelled as "P.D.O. Vinagre de Jerez" were purchased in a specialized local shop. According to the current legislation (3), all of them presented a six-months-ageing in wood barrels, and their acetic degree and pH value were 7% (w/v) and approx. 2.90,

respectively. Their sensory evaluation showed a similar aromatic profile but some of them presented a higher complexity so, we decide to choose the three ones with the greatest aromatic richness. This greater richness was corroborated with the highest GCO response (both in number of odorants and intensity of the odours perceived).

## 2.2. Reagents and chemicals

The chemical standards of the aroma compounds were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and Lancaster (Bischheim, France). Their CAS numbers are specified in **Table 1** and their purity was above 90% in all cases. 4-methyl-2-pentanol (Fluka, Madrid, Spain) was employed as internal standard and pure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, USA). Acetic acid (HPLC grade), NaOH and NaCl (both reagent grade) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain).

To prepare the stock standard solutions (employed both for the odour threshold determination and the calibration graphs elaboration) and to dilute the samples on the AEDA study, we used an acetic acid water solution at 7% (w/v) with pH adjusted to 2.9 in order to get a similar matrix to real samples. To avoid odour interferences, this hydroacetic solution was filtered employing an Empore™ extraction disk with activated carbon (3M Bioanalytical Technologies, Minnesota, USA). The cleaned hydroacetic solution was analyzed by HS-SPME and GCO and the absence of odours in this analysis corroborated the effectiveness of this cleaning procedure.

The different stock standard solutions were stored at 4 °C.

## 2.3. SPME

The SPME holder for manual sampling and the polydimethylsiloxane (PDMS) 100 µm, Carboxen-Polydimethylsiloxane (Carboxen/PDMS) 75 µm and StableFlex Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 µm fibres used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). All the fibres were conditioned before use and thermally cleaned between analyses by inserting them into the GC injection port at the temperature recommended by the producer.

#### 2.4. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

The optimum conditions that allowed extracting the highest number and intensity of odorants were achieved by placing 10 mL of sample into a 20 mL glass vial with 3.5 g of NaCl and a little magnetic stir bar (as the extraction was carried out under constant magnetic stirring), being the sample/headspace ratio 1:1. After tightly capping the vial with a silicon septum under nitrogen atmosphere, it was pre-equilibrated for 15 min at 50 °C in a thermostatic bath. Then, the SPME device was manually pushed through the vial septum and the fibre was exposed to the headspace vial for 2 hours at 50 °C. Afterwards, the fibre was pulled into the needle assembly and the SPME device was removed from the vial. Finally, it was inserted into the injection port of the GC-FID for thermal desorption of the analytes at 270 °C for 1 min in the splitless mode.

#### 2.5. Gas chromatography analysis

##### 2.5.1. GC-FID and GCO

Samples were analyzed on a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and an olfactory detector. To carry out the chromatographic separations, a Chrompack (Varian, Middelburg, The Netherlands) CP-WAX 57CB (50 m x 0.25 mm i.d., 0.2 µm film thickness) fused silica capillary column was employed and the oven temperature was programmed as follows: 40 °C (2 min), 5 °C min<sup>-1</sup> to 220 °C (22 min). To verify the identity of the compounds, an HP-5 (Agilent Technologies, USA) (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) fused silica capillary column was used with the following oven temperatures: 40 °C (5 min), 3.5 °C min<sup>-1</sup> to 120 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> to 210 °C (10 min). In both cases, helium was the carrier gas at a constant flow-rate of 1 mL min<sup>-1</sup>, the split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270 °C for 1 min and the temperature of the FID was set at 250 °C.

GCO analyses were carried out using an olfactory detector commercialized by SGE International (Ringwood, Australia) that presented an outlet splitter system (ODO-I) which provided a continuously variable range of split ratios thanks to a micro control valve (OSS-2). The chosen split ratio for the olfactometric analysis was 1:10 (FID:sniffing port). Two deactivated and uncoated fused silica capillaries of the same length and width were used as transfer lines between the valve and the detectors. In addition, the olfactory detector control module incorporated a heated transfer section from the GC oven to the glass detection cone, what kept the unit at a suitable temperature to transfer the volatiles to the detection cone without losses due to condensation. Furthermore, the

glass cone is purged with humidified air to prevent nasal mucous membranes from drying out in order to maintain olfactory sensitivity.

Timing and odour descriptions were recorded by two trained sniffers (replaced at 15 min intervals to avoid fatigue) after each sample injection. Each trained researcher analyzed each extract in triplicate and three different fibres were employed to take into account the efficiency variability of the SPME StableFlex fibres.

### **2.5.2. GC-MS**

A Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph coupled to an HP-5973 mass selective detector (MSD) was used to perform the GC-MS analyses. The mass spectrometer operated in the electron impact ionization mode (70 eV) and the mass range was from 35 to 300 amu, while interface, source and quadrupole temperatures were 200 °C, 230 °C and 150 °C, respectively. Separation was achieved under the same operating conditions mention before and using the same columns as in the GC-FID and GCO analyses. The split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270 °C for 1 min.

### **2.6. Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)**

The Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) involves stepwise dilution of the aromatic extract with a solvent followed by an evaluation of each dilution by GCO, what leads to a hierarchically classification of the most odour-active compounds based on the flavour dilution (FD) factors. However, the usual AEDA cannot be used when dealing with the SPME technique because no physical extract is obtained. As the analytes are retained on the fibre and it is not possible to dilute them, an approach to the AEDA developed in our laboratory (22) was applied. It consists of successively dilutions (1:4) of the Sherry vinegar samples with a hydroacetic solution before performing the SPME. Dilutions were carried out until no odorant was detected by sniffing the highest dilution. Two experienced sniffers performed the AEDA experiments in triplicate and their response to the individual compounds did not differ by more than 2 FD-factors.

### **2.7. Compounds identification**

The odorants perceived in the olfactometric study were identified by comparison with the reference compounds (analyzed under identical conditions) on the basis of the following criteria: odour quality detected at the sniffing port, mass spectra obtained and retention indices (RI) determined on the

two stationary phases of different polarity employed (CP-WAX 57CB and HP-5). Retention indices were calculated from the retention times of a series of *n*-alkanes (from 6 to 26 carbon atoms) injected under the same chromatographic conditions.

## 2.8. Sensory analysis

12 trained non-smoker individuals (8 women and 4 men, between 25 and 42 years old) constituted the test panel that performed the sensory experiments, all of them belonging to the Department of Analytical Chemistry of the Rovira i Virgili University and with previous sensory analysis experience. To get used to testing acetic acid matrices, they were subjected to a specific training: different single standard solutions, and also mixtures of them, were prepared in a 7% (w/v) hydroacetic solution at various concentration levels. The panellists were asked to describe the odour detected and to rate the intensity perceived in a scale from 0 to 5 for each standard (i.e. each odour quality) and concentration, which was also used to evaluate the panel response. The training was carried out twice a week during five consecutively weeks, lasting each session 60 minutes. The coefficients of variance of each single panellist for every sample replicates were less than 10%. To evaluate the panel performance as a whole, one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out.

## 2.9. Thresholds determination

Threshold values were determined by the three-alternative forced choice (3-AFC) test (24, 25), that consists in three samples, two controls and one spiked sample among which assessors are instructed to guess (forced choice) when they cannot perceive a difference.

Firstly, the threshold values of the different odorants were looked up in the literature (26), although most of them had not been calculated in a vinegar matrix. Even so, these thresholds were chosen as the odorants concentrations (*x* values) to delimit a first concentration working range. Then, five 2-fold dilutions ( $x/8$ ;  $x/2$ ;  $x$ ;  $2x$  and  $8x$ ) were prepared in a 7% (w/v) acetic acid water solution for each substance whose threshold was to be determined, and the five 3-AFCs were given to the panellists in ascending order (most diluted first). For each level, all the solutions were labelled with a randomized three-digit number and the appearance order for the spiked sample was also random.

More diluted or concentrated solutions were prepared when necessary for each panellist so, finally, it was possible to relate each assessor to two concentration values for each odorant: the lowest was the one where the odour was not still perceived and the highest, where the odour was detected for

the first time. Individual thresholds were calculated by the best-estimate criterion: the threshold for each individual was the geometric mean between the last concentration missed and the first concentration detected for all the sensory sessions. The final threshold was the geometric mean of each panellist best estimates for each compound (24, 25).

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Optimization of HS-SPME parameters

The chromatographic areas of the extracted compounds (FID response) not always present a correlation with the sensory perception, so it is not enough to consider this fact when optimizing the parameters that affect the aroma extraction efficiency. Therefore, we decided to evaluate the number and intensity of the odorants perceived (GCO response) as well. All the experiments were performed in triplicate and we used more than one SPME fibre to take into account their variability response, although the reproducibility of the fibres has considerably been improved during the last years.

The first parameter considered was the SPME fibre coating chosen. The coatings checked were those that, according to their specifications, were the most appropriate to extract aroma compounds: CAR/PDMS (low molecular weight compounds), PDMS (volatiles) and DVB/CAR/PDMS (volatiles and semi-volatiles). The results obtained, when extracting the same vinegar with different fibres, showed that the DVB/CAR/PDMS fibres presented higher extraction efficiency. Thus, whereas with PDMS the number of odour-active regions was between 35-40 and for CAR-PDMS was between 55-60, when using DVB/CAR/PDMS, up to 79 odorant regions were detected, so this last fibre coating was selected.

The extraction efficiency is greatly affected by the headspace volume (27), so the next parameter studied was the sample/headspace ratio. Experiments with 20 and 50 mL vials and different sample volumes (5, 10 and 25 mL) were carried out. The results showed that the extraction efficiency improved as the headspace decreased, being 1/1 the optimum sample/headspace ratio, whatever the vial considered. However, and in order to use the minimum amount of sample in each analysis, it was decided to work with 10 mL of sample in a 20 mL vial. Related to ionic strength, the higher it was the better response obtained, so samples were saturated by adding 3.5 g of NaCl.

In SPME, extraction time and temperature are deeply related, so both parameters were studied simultaneously. Thus, different experiments in the range from 2 to 4 hours (times under 2 hours did not ensure the suitable aromatic perception of all the odorants) and from 30 to 50 °C were carried

out. The experiments showed that the shortest sampling time and the lowest temperature (2 h, 30 °C) provided the poorest chromatographic and olfactometric profiles. Meanwhile, the largest time and the highest temperature (4 h, 50 °C) did not improve the overall extraction efficiency because of the exothermic character of the SPME technique. Therefore, as the chromatographic and olfactometric responses obtained at 2 h and 50 °C did not significantly differ (less than 5%) from the ones obtained at 3 h and 40 °C, we decided to reduce the sample preparation step by employing the shortest extraction time (2 h, 50 °C).

As a result, the optimum HS-SPME conditions were achieved by placing 10 mL of sample into a 20 mL glass vial with 3.5 g of NaCl and a little magnetic stir bar. Extraction was performed during 2 hours at 50 °C under constant magnetic stirring.

Regarding the precision of the method, it was assessed in terms of within-day repeatability and between-days repeatability (intermediate precision). Although both precision parameters were sensory evaluated in the sniffing port, it was difficult to quantify them. Therefore, to obtain an objective evaluation we used the chromatographic response of the aromatic compounds and we expressed both parameters by means of the percentage of relative standard deviation (%RSD) of that response. Thus, while the repeatability was calculated by the consecutive injection of 5 different extracts obtained the same day, the intermediate precision was calculated after the injection of 6 different extracts obtained over a month. In both cases the results were very good since we obtained  $RSD < 4.7\%$  for repeatability and  $RSD < 7.3\%$  for intermediate precision.

### **3.2. Extract representativeness**

Although the best conditions above specified allowed obtaining the highest number and intensity of odorants, it should not be forgotten that the aroma representativeness of the sample extract is the most important parameter to ensure the reliability of the results when characterizing that sample aroma. Therefore, 12 trained assessors evaluated the similarity between the aroma of the three Sherry vinegars considered and the aroma extracted by the HS-SPME technique. To evaluate the global perception of the compounds retained on the SPME fibre, the direct gas chromatography-olfactometry technique (D-GCO) (23, 28) was employed. This technique avoids chromatographic separation of the extract constituents, so the analyst perceives the extract as a whole at the sniffing-port. When asking the panellists about the degree of similitude between the extracts and the real sample, they found an 85% (5% RSD) of likeness whatever the Sherry vinegar evaluated. Therefore, this great similitude indicated that the SPME is a good and fast technique to obtain representative aroma extracts of samples so complex such as vinegars.



### 3.3. HS-SPME-GCO

The aroma of the three Sherry vinegars considered in this study were extracted and concentrated by HS-SPME and analyzed by GCO. The results showed slight differences in the number of odour-active regions detected: while 70 aromatic areas were recorded for the A sample, 65 and 79 were perceived for the B and C samples, respectively. Furthermore, most of the odour-active regions coincided in the three samples both in their retention times and the descriptors used to describe the odours detected. In all cases, and as happens when a polar column is employed to carry out similar flavour studies (18, 22, 23), chemical and fruity odours appeared at lower retention indices. Then earthy and green notes were detected, followed by lactic and fatty ones. Afterwards, sweet and flowery odours appeared and finally, at the end of the GCO analysis, smoky and disgusting notes were perceived.

To evaluate the sensory contribution of each odorant to the whole sample aroma and to get a first hierarchical classification of the odorants in commercial Sherry vinegar, the volatiles extracted with the HS-SPME technique were analyzed by using the approach to the AEDA previously developed in our laboratory (22). This approach has demonstrated to be a valuable screening tool for ranking odour-active compounds in a sample according to their relative odour potency (22, 23). It involves stepwise dilution of the sample (therefore, of its aroma) followed by SPME and the subsequent evaluation of each dilution by GCO until no odours are perceived in the GCO effluent. As defined when using the classical AEDA (29, 30), the last dilution step where an odorant is perceived is its flavour dilution (FD) factor that can be regarded as a good indicator of the odour potency of that compound.

The odour-active regions with higher FD factors (ranging from 64 to 8192 for at least one of the three samples) are reported in **Table 1**, where they have been arranged according to their retention indices in the polar column. As can be seen, among the different odour-active regions only 2 of them were not detected for the A sample (regions number **37** and **46**, which were not identified), 3 of them were not perceived for the B sample (areas number **9** –identified as isobutanol-, number **25** –unknown- and number **41** –identified as heptanoic acid-) and only the flavour-active region number **39** (benzyl alcohol) was not detected in the C sample. From these results, and as usual when dealing with different samples of the same product, we could conclude that the odorants responsible for the Sherry vinegar aroma are almost the same whatever the sample considered and that the differences among samples are given by the perception intensity of some of these odorants (i.e. different flavour dilution (FD) factors). In fact, only 5 odour-active regions were detected with the same FD in all the samples: 4 regions with a FD of 4096, described as “strawberry”, “earthy, fatty”, “blue

cheese, sweat”, and “sweet, honey”, which corresponded to regions number **3**, **20**, **29** and **44**, and 1 with a FD of 1024 that was described as “paper-like” (region **26**).

As shown in **Table 1**, some of the identified odorants had been previously reported in Sherry vinegars either as volatile (7, 8, 10, 12, 13) or aromatic (18, 19) compounds, but 13 of them were detected in Sherry vinegar aroma for the first time. These are the ones summarized in **Table 2**, whose odour thresholds in an acetic acid water solution were also determined: 2 pyrazines (3-isopropyl-2-methoxypyrazine, and 3-isobutyl-2-methoxypyrazine), 2 sulphur compounds (methanethiol and dimethyltrisulphide), 1 insaturated ketone (1-octen-3-one), 1 norisoprenoid ( $\beta$ -damascenone), 1 ester (ethyl trans-cinnamate) and 6 aldehydes (2 and 3-methylbutanal, octanal, nonanal, (E)-2-nonenal and (E,E)-2,4-decadienal).

odorant	sensory threshold (ng L <sup>-1</sup> )	FD factor		
		A	B	C
3-isopropyl-2-methoxypyrazine	10	4096	8192	4096
3-isobutyl-2-methoxypyrazine	22	1024	1024	4096
Dimethyltrisulphide	35	4096	64	64
Methanethiol	160	1024	1024	64
$\beta$ -damascenone	190	1024	4096	1024
(E,E)-2,4-decadienal	435.6	1024	4096	1024
Ethyl trans-cinnamate	480	4096	4096	4096
(E)-2-nonenal	1500	1024	1024	1024
1-octen-3-one	6800	4096	4096	1024
Nonanal	18200	16	256	1024
Octanal	22500	4096	1024	1024
3-methylbutanal	31600	4096	16	16
2-methylbutanal	84300	4096	16	16

**Table 2.** Sensory thresholds of the odorants found in Sherry vinegar for the first time

The presence of 3-alkyl-2-methoxypyrazines could be due to their natural origin in grapes (31) and, although they are characteristic of some varieties such as Cabernet sauvignon, Merlot noir and Sauvignon blanc (32), they have also been identified in some aged red wines (33). Regarding sulphur compounds, they are mostly released during alcoholic fermentation by the degradation of odourless precursors, such as S-cysteine conjugates. However, the origin of these compounds in wines is still being investigated and alternative biogenetic pathways involving conjugated carbonyl compounds, or the S-glutathione conjugate, have either been hypothesised or evidenced (34, 35). Related to 1-octen-3-one, it is a common constituent of the gas chromatographic odour (GCO) profile of normal dry wines and it is a naturally occurring compound in grapes (36). On the other hand,  $\beta$ -

damascenone has its source in grape carotenoid degradation (37), ethyl trans-cinnamate comes from the alcoholic fermentation in wines (38), 3-methylbutanal can be considered an amino acid derivative (39) and (E)-2-nonenal is a product of the oxidative degradation of unsaturated fatty acid (40). Moreover, the formation of aldehydes in vinegars, as occurred in wine, could be related to changes in aroma properties linked to oxidation (41) and it is also known that the aldehydes with 8-10 carbon atoms can be considered strong odorants because of their sensory properties (42, 43).

**Table 2** also shows the FD factors of these odorants for each sample and their sensory thresholds, what in some cases are at  $\text{ng L}^{-1}$  levels. Because of their high FD values, it could be thought that *a priori* they could contribute significantly to the overall aroma of the sample, despite their low concentrations. Indeed, these low concentrations imply the use of a concentration technique such as SPME to be detected. Even so, although we could perceive all of them by GCO, only some of them were detected when applying a conventional detector.

However, although the FD factors provided a first hierarchical classification of the odorants detected, it was necessary to use other parameters to get more precise information about the real contribution of each odorant to the overall sample aroma.

#### 3.4. Odour Activity Value (OAV)

Odour activity value (OAV) was obtained by dividing the concentration of the compound in a matrix by its odour threshold in that matrix (5). Although this parameter provides a rough pattern of the sensory importance of the odorants, it allows turning the quantitative data into sensorial information. So it is generally assumed that the odorants with higher OAVs contribute in a stronger manner to the overall aroma.

Therefore, once the most potent odorants were determined, it was necessary to quantify them with the aim to calculate their OAVs. To make as simple as possible the methodology used to carry out the quantification, the extract employed for this purpose was the same that the one used to perform the GCO analysis. Taking into account the matrix interference that hindered the use of calibration curves constructed with model solutions, we elaborated the calibration graphs by using the addition standard method and extracting the spiked samples under the same HS-SPME extraction conditions above specified (section 2.4). Thus, the most potent odour-active compounds according to the AEDA results were quantified, except those with so extremely low concentrations that it was not possible to obtain any instrumental signal when using a FID or a MSD. This is what

happened with 3-alkyl-2-methoxy-pyrazines, 1-octen-3-one or the sulphur compounds, among others. **Table 3** summarizes the mean concentrations of the odorants quantified.

compound	mean concentration $\pm$ sd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		
	A	B	C
Ethyl isobutyrate	462.9 $\pm$ 8.5	303.1 $\pm$ 12.7	391.9 $\pm$ 17.6
Diacetyl	117.5 $\pm$ 4.9	60.8 $\pm$ 13.8	177.7 $\pm$ 16.7
Ethylbutyrate	16.3 $\pm$ 0.7	23.1 $\pm$ 3.7	17.2 $\pm$ 2.1
Ethyl 2-methylbutyrate	10.0 $\pm$ 0.7	26.5 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.2
Ethyl isovalerate	277.5 $\pm$ 7.2	301.6 $\pm$ 1.7	299.5 $\pm$ 2.5
Isobutanol	1752.4 $\pm$ 55.4	<i>nd</i>	2042.9 $\pm$ 27.6
Isoamyl acetate	1071.7 $\pm$ 7.9	840.2 $\pm$ 62.67	1315.6 $\pm$ 24.6
2-methyl-1-butanol	2949.1 $\pm$ 33.0	3086.6 $\pm$ 69.1	2774.9 $\pm$ 14.2
Isoamyl alcohol	3674.9 $\pm$ 35.5	3812.1 $\pm$ 17.5	3306.0 $\pm$ 12.2
Octanal	14.1 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 1.8	11.7 $\pm$ 1.1
Isobutyric acid	2460.5 $\pm$ 19.1	1801.9 $\pm$ 69.6	3622.0 $\pm$ 111.7
2-methylbutyric acid	2301.0 $\pm$ 107.6	1989.3 $\pm$ 81.9	2523.0 $\pm$ 181.4
Isovaleric acid	6643.0 $\pm$ 226.9	6110.1 $\pm$ 325.0	5830.8 $\pm$ 120.7
Benzyl acetate	13.2 $\pm$ 0.2	20.5 $\pm$ 0.6	10.4 $\pm$ 0.4
Ethyl phenylacetate	988.3 $\pm$ 2.6	117.2 $\pm$ 0.4	385.5 $\pm$ 1.7
2-phenylethyl acetate	462.3 $\pm$ 16.0	388.4 $\pm$ 21.0	240.9 $\pm$ 21.0
$\beta$ -damascenone	0.21 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03
Phenylmethanol	120.2 $\pm$ 12.7	63.4 $\pm$ 6.6	<i>nd</i>
2-phenylethanol	6514.2 $\pm$ 132.4	7993.1 $\pm$ 133.0	9511.3 $\pm$ 161.0
4-ethylguaiacol	2971.4 $\pm$ 87.5	664.4 $\pm$ 1.8	1603.9 $\pm$ 29.6
4-ethylphenol	71.7 $\pm$ 0.5	81.3 $\pm$ 4.7	79.8 $\pm$ 6.0
Decanoic acid	126.7 $\pm$ 3.326	122.7 $\pm$ 1.5	31.5 $\pm$ 5.5

**Table 3.** Mean concentrations of the potent odorants found in Sherry vinegars

In addition, we determined the sensory thresholds of the most potent odorants identified by means of GCO and AEDA. In order to determine these values in a matrix as similar as possible to the real one, an acetic acid water solution was employed. The values obtained can be seen in **Table 4** together with the OAVs calculated for each quantified compound in every Sherry vinegar sample.

When comparing these values with those obtained by other authors that previously identified some of these compounds in Sherry vinegar aroma, we could check that the relative OAVs for ethyl isovalerate, ethyl isobutyrate, isoamyl acetate, isovaleric acid or 2-phenylethyl acetate agreed with the ones reported by Callejón *et al.* (19). However, there was no coincidence when comparing 4-

ethylphenol and diacetyl, as these authors obtained higher OAVs. In fact, diacetyl presented the highest OAV in their study. But these differences could be attributed to the different extraction procedures employed and also to the lower odour threshold reported by Callejón *et al.* for both compounds:  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  vs  $51 \mu\text{g L}^{-1}$  regarding 4 ethylphenol, and  $40 \mu\text{g L}^{-1}$  vs  $95.3 \mu\text{g L}^{-1}$  regarding diacetyl.

odorant	sensory threshold ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Odour Activity Values (OAV)		
		A	B	C
Ethyl isovalerate	2.2	126	137	136
Ethyl isobutyrate	5.2	89	58	75
Isoamyl acetate	22.2	48	38	59
Isovaleric acid	144.4	46	42	40
4-ethylguaiaicol	69.5	43	9.6	23
2-methylbutyric acid	200.5	11	9.9	12
2-phenylethanol	1400	4.6	5.7	6.8
2-phenylethyl acetate	97.8	4.7	4.0	2.5
Isobutyric acid	1500	1.6	1.2	2.4
4-ethylphenol	51	1.4	1.6	1.6
Ethyl phenylacetate	148.2	6.7	0.79	2.6
Diacetyl	95.3	1.2	0.64	1.9
$\beta$ -damascenone	190 <sup>a</sup>	1.1	1.5	0.74
Isoamyl alcohol	3500	1.0	1.1	0.94
Ethyl 2-methylbutyrate	16.5	0.61	1.6	0.44
Octanal	22.5	0.63	0.48	0.52
Ethylbutyrate	73	0.22	0.32	0.24
2-methyl-1-butanol	12200	0.24	0.25	0.23
Isobutanol	7500	0.23	<i>nd</i>	0.27
Decanoic acid	1100	0.11	0.11	$29 \cdot 10^{-3}$
Phenylmethanol	5100	$23 \cdot 10^{-3}$	$12 \cdot 10^{-3}$	<i>nd</i>
Benzyl acetate	2300	$5.7 \cdot 10^{-3}$	$8.9 \cdot 10^{-3}$	$4.5 \cdot 10^{-3}$

<sup>a</sup>Concentration in  $\text{ng L}^{-1}$

**Table 4.** Odour thresholds and Odour Activity Values (OAV) calculated for the quantified odorants

Finally, focusing again on the results showed in **Table 4**, there are 10 compounds with OAVs >1 in the three vinegars analyzed. These compounds, together with their FD values, are displayed in a spider-web (**Figure 1**). As it can be seen from this figure, the profile obtained is quite similar whatever the sample considered, except for isobutyric acid, 4-ethylguaiaicol and, in less extent, 2-phenylethanol. To check the real contribution of these 10 compounds to the Sherry vinegar aroma, a very simple similarity test was performed: we added all these compounds to a 7% (w/v) hydroacetic solution at the same concentration to that they were found in each vinegar. Then, panellists were

asked to evaluate the similarity between the spiked solution and the real vinegars. The results showed a degree of similarity of 49, 46 and 51% (RSD 5%) for vinegars A, B and C, respectively. According to the panellists' description, this relative low percentage was related to a much higher perception of the pungent sensation in the spiked sample mainly due to the acetic acid. Therefore, we performed a second similarity test, but this time adding all the compounds quantified. In this case, panellists agreed with the fact that the pungent sensation was balanced thanks to the higher aromatic richness of the spiked solution, and, when rating the degree of similarity, they gave a punctuation of 67, 63 and 70% (RSD 6%) for vinegars A, B and C, respectively. So, these results agree with the ones obtained in the GC-olfactometric study because, as it can be seen, the most important aromatic compounds, those that play the most relevant role in Sherry vinegar aroma, are almost the same whatever the sample considered. Only slight differences are perceived among samples regarding the perception intensity of the odorants, which makes possible the characteristic organoleptic properties of every Sherry vinegar sample.

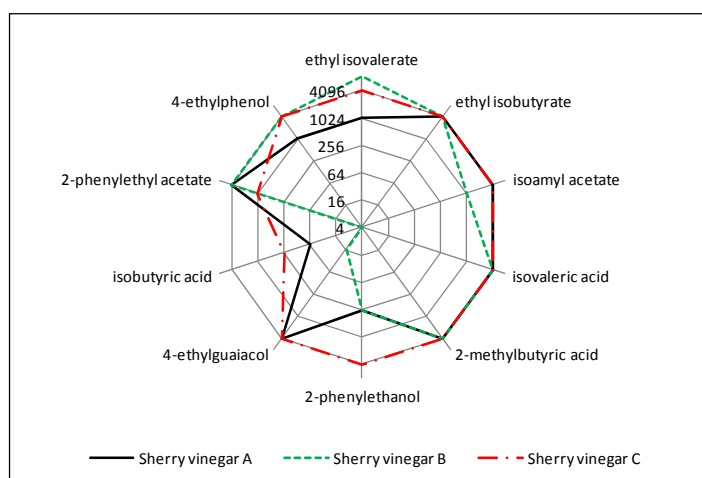


Figure 1. Spider-web for the odorants with OAVs  $\geq 1$  for the three Sherry vinegar samples

From the results, we can conclude that the HS-SPME technique when using a DVB/CAR/PDMS fibre is suitable for extracting and analyzing the odour compounds in vinegar matrices. Moreover, it requires shorter sampling times and minimum sample handling compared with the conventional extraction methods (i.e. liquid-liquid extraction). As explained, some of the key odorants determined in this study have been reported as aromatic compounds in Sherry vinegar aroma for the first time and their odour thresholds have been determined in a hydroacetic solution. Then, the approach to the AEDA applied has allowed us to establish a hierarchy on the contribution of each compound to

Sherry vinegar aroma, which has been confirmed by the OAVs calculated. Nevertheless, to finally give more accurate results about the real contribution of the different constituents to the overall Sherry vinegar aroma it will be necessary to overcome the limitations of the instrumental detector (e.g. by using a MS detector in SIM mode) to make possible the quantification of all the odorants detected by GCO and to perform complete reconstitution studies that will be the future aim of our studies.

#### **Acknowledgements**

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (project AGL2007-61550).

**Table 1.** Main odorants found in Sherry vinegar with FD  $\geq$  64 at least in one of the three samples

odour-active regions	RT (min)	R <sub>ion</sub>		odour description	FD factor			odorous	CAS no.	identification			Previously reported in Sherry vinegar	
		CP-WAX	HP-5		A	B	C			MSD				
										A	B	C		R <sub>I</sub>
1	4.9	a	b	cabbage, sewer	1024	1024	64	methanethiol	74-93-1	a			X	
2	6.5	890	a	malty, bitter almonds	4096	16	16	2 / 3-methylbutanal	96-17-3	X	X	X	X	
3	7.1	950	a	strawberry	4096	4096	4096	ethyl isobutyrate	590-86-3	X	X	X	X	7, 12, 18, 19
4	7.4	970	b	butter	4096	1024	4096	diacetyl	431-03-8	X	X	X	X	18, 19
5	7.6	990		plastic, rubbery	1024	4096	256	unknown						
6	8.4	1032	801	fruity, strawberry	64	256	64	ethylbutyrate	105-54-4	X	X	X	X	7, 12, 18, 19
7	8.7	1050	843	fruity, pineapple	1024	8192	1024	ethyl 2-methylbutyrate	7452-79-1	X	X	X	X	12, 18, 19
8	9.1	1062	852	fruity, solvent	1024	8192	4096	ethyl isovalerate	108-64-5	X	X	X	X	7, 18, 19
9	9.9	1105	nd	sulphury, disgusting	256	nd	4096	isobutanol	78-83-1	X	X	X	X	7, 8, 10, 12, 19
10	10.2	1119	881	banana, glue-like	4096	1024	4096	isoamyl acetate	123-92-2	X	X	X	X	7, 8, 10, 12, 18, 19
11	11.7	1168		fruity solvent, rancid	64	64	1024	unknown						
12	12.8	1214	756	solvent, bitter almonds	64	256	16	2-methyl-1-butanol	137-32-6	X	X	X	X	7, 8, 10, 12, 19
13	12.8	1219	710	solvent, bitter almonds	64	256	16	isoamyl alcohol	123-51-3	X	X	X	X	7, 8, 10, 12, 13, 18, 19
14	14.6	1290	1001	citrus, fresh	4096	1024	1024	octanal	124-13-0	X	X	X	X	
15	14.9	1306	975	mushroom	4096	4096	1024	1-octen-3-one	4312-99-6				X	
16	16.9	1368	965	sulphur-like	4096	64	64	dimethyltrisulphide	3658-80-8	X	X	X	X	
17	17.5	1397	nd	citrus, flowery	16	256	1024	nonanal	124-19-6	X	X	X	X	
18	17.6	1410		mushroom-like, earthy	256	4096	1024	unknown						
19	18.3	1427	nd	green, earth	4096	8192	4096	3-isopropyl-2-methoxyppirazine	25773-40-4	c	c	c	X	
20	18.6	1445		earthy, fatty	4096	4096	4096	unknown						
21	19.2	1459	907	cooked potato	1024	256	1024	methional	3268-49-3	c	c	c	X	18
22	19.8	1512		fresh, green	4096	1024	4096	unknown						
23	20.3	1529	nd	leaf-like	64	64	256	unknown						



24	20.6	1532	1191	1024	1024	4096	3-isobutyl-2-methoxy-pyrazine	24683-00-9	X	X
25	20.8	1538		256	nd	256	unknown		X	
26	20.9	1546	1160	1024	1024	1024	(E)-2-nonenal	18829-56-6	X	X
27	21.8	1590	1232	64	4	256	isobutyric acid	79-31-2	X	X, 7, 12, 13, 18
28	23.2	1644	nd	1024	4096	4096	butyric acid	107-92-6	X	X, 7, 12, 13, 18
29	23.7	1675	879	4096	4096	4096	2-methylbutyric acid	116-53-0	X	X, 10
							isovaleric acid	503-74-2	X	X, 7, 12, 13, 18, 19
30	24.9	1728	1324	1024	4096	1024	(E,E)-2,4-decadienal	25152-84-5	X	X
31	25.2	1739	nd	1024	4096	1024	benzyl acetate	140-11-4	X	X, 7, 10, 12, 13, 19
32	26	1770		256	64	4096	unknown			
33	26.6	1817	1243	256	16	256	ethyl phenylacetate	101-97-3	X	X, 10, 12, 13, 18, 19
34	27	1839		4096	8192	4096	unknown			
35	27.2	1845	1257	4096	4096	1024	2-phenylethyl acetate	103-45-7	X	X, 7, 10, 12, 13, 18, 19
36	27.4	1851	1383	1024	4096	1024	$\beta$ -damascenone	23726-93-4	X	X, 7, 10, 12, 13, 18, 19
37	27.8	1870		nd	4096	256	unknown			
38	28.5	1899	1093	4096	4	1024	guaiacol	90-05-1	X	X, 13, 18, 19
39	28.7	1915	1039	4096	16	nd	phenylmethanol	100-51-6	X	X, 7, 10, 12, 13, 18, 19
40	29.6	1957	1119	256	256	4096	2-phenylethanol	60-12-8	X	X, 7, 10, 12, 13, 19
41	30.2	1986	nd	4	nd	256	heptanoic acid	111-14-8	X	X, 18
42	30.7	2022		1024	4096	1024	unknown			
43	31.7	2089	1281	4096	16	4096	4-ethylguaiacol	2785-89-9	X	X, 10, 12, 13, 18
44	33.4	2178	1466	4096	4096	4096	ethyl trans-cinnamate	103-36-6	X	X
45	34.3	2217	1182	1024	4096	4096	4-ethylphenol	123-07-9	X	X, 10, 12, 13, 18, 19
46	34.6	2245		nd	4096	1024	unknown			
47	35.1	2320	1377	4096	4096	4	decanoic acid	334-48-5	X	X, 7, 10, 12, 13, 18, 19

$\sigma$ : RI not calculated due to solvent interference

b: RI<RI of the first alkane (C6)

FD: Flavour Dilution

nd: not detected

RT: Retention Time on a CP-WAX 57CB

RI: Retention Index on different stationary phases

c: identification not possible due to acetic acid interference

## LITERATURE CITED

- (1) Mazza, S.; Murooka, Y. Vinegars through the ages. In *Vinegars of the world*; Solieri, L., Giudici, P., Eds.; Springer: Milan, Italy, 2009; 17-39.
- (2) Tesfaye, W.; Morales, M. L.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. Improvement of wine vinegar elaboration and quality analysis: instrumental and human sensory evaluation. *Food Reviews Int.* **2009**, *25*, 142-156.
- (3) Resolución de 24 de marzo de 2009 por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida "Vinagre de Jerez". Boletín Oficial del Estado de 13 de abril de 2009; Núm. 90, 34603-34613.
- (4) Tesfaye, W.; Morales, M. L.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. Jerez vinegar. In *Vinegars of the world*; Solieri, L., Giudici, P., Eds.; Springer: Milan, Italy, 2009; 179-195.
- (5) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Aroma Compounds. In *Food Chemistry*, third revised edition; Springer: Berlin, Germany, 2004; 342-408.
- (6) Cabezudo, M. D.; Gorostiza, E. F.; Herraiz, M.; Fernández-Biarge, J. García-Domínguez, J. A.; Molera, M. J. Mixed columns made to order in gas chromatography. IV. Isothermal selective separation of alcoholic and acetic fermentation products. *J. Chromatogr. Sci.* **1978**, *16*, 61-67.
- (7) Blanch, G. P.; Tabera, J.; Sanz, J.; Herraiz, M.; Reglero, G. Volatile composition of vinegars. Simultaneous distillation-extraction and gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1046-1049.
- (8) Troncoso, A. M.; Guzmán, M. Volatile components in Andalusian vinegars. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 130-133.
- (9) Morales, M. L.; Tesfaye, W.; García-Parrilla, M. C.; Casas, J. A.; Troncoso, A. M. Sherry wine vinegar: physicochemical changes during the acetification process. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, *81*, 611-619.
- (10) Natera Marín, R.; Castro Mejías, R.; García Moreno, M. V.; García Rowe, F.; García Barroso, C. Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar. Validation study. *J. Chromatogr. A* **2002**, *967*, 261-267.
- (11) Tesfaye, W.; García-Parrilla, M. C.; Troncoso, A. M. Sensory evaluation of Sherry wine vinegar. *J. Sensory Studies* **2002**, *17*, 133-144.
- (12) Durán Guerrero, E.; Natera Marín, R.; Castro Mejías, R.; García Barroso, C. Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: validation study and comparison with solid phase microextraction. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1167*, 18-26.

- (13) Chinnici, F.; Durán Guerrero, E.; Sonni, F.; Natali, N.; Natera Marín, R.; Riponi, C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) characterization of volatile compounds in quality vinegars with protected European geographical indication. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4784-4792.
- (14) Holley, A. Processing information about flavour. In *Flavour in Food*, first edition; Voilley, A., Etiévant, P., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England, 2006; 36-61.
- (15) Mayol, A. R.; Acree, T. E. Advances in gas chromatography-olfactometry. In *Gas chromatography-olfactometry. The state of the art*, first edition; Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T. E., Eds.; ACS Symposium Series, Washington D.C., Washington, 2001; 1-10.
- (16) Zellner, B. A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavor analysis. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 123-143.
- (17) Charles, M.; Martin, B.; Ginies, C.; Etiévant, P.; Coste, G.; Guichard, E. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 70-77.
- (18) Callejón, R. M.; Morales, M. L.; Troncoso, A. M.; Silva Ferreira, A. C. Targeting key aromatic substances on the typical aroma of Sherry vinegar. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6631-6639.
- (19) Callejón, R. M.; Morales, M. L.; Silva Ferreira, A. C.; Troncoso, A. M. Defining the typical aroma of Sherry vinegar: sensory and chemical approach. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8086-8095.
- (20) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-2148.
- (21) Wardencki, W.; Michulec, M.; Curylo, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 703-717.
- (22) Martí, M. P.; Mestres, M.; Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J. Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7861-7865.
- (23) Aceña, L.; Vera, L.; Guasch, J.; Busto, O.; Mestres, M. Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachio aroma. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7781-7787.
- (24) AMST Standard Practice Designation E 679-91. *Standard Practice for Determination of Odor and Taste Thresholds by a Forced-Choice Ascending Concentration Series Method of Limits*; ASTM International: Philadelphia, PA. 2004; 34-38, doi: 10.1520/E0679-04.
- (25) Plotto, A.; Margaría, C. A.; Goodner, K. L.; Goodrich, R.; Baldwin, E. A. Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: terpenes and aldehydes. *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 491-498.

- (26) Rychlik, M.; Schieberle, P.; Grosch, W. *Compilation of odor thresholds, odor qualities and retention indices of key food odorants*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München: Garching, Germany, 1998.
- (27) Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*; Wiley-VCH Inc.: New York, New York, 1997.
- (28) Rega, B.; Fournier, N.; Guichard, E. Solid phase microextraction (SPME) of orange juice flavor: odor representativeness by direct gas chromatography-olfactometry (D-GC-O). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7092-7099.
- (29) Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavor compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277-282.
- (30) Schieberle, P.; Grosch, W. Evaluation of the flavor of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 111-113.
- (31) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A* **2000**, *880*, 93-99.
- (32) Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M. P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A* **2002**, *953*, 1-6.
- (33) Culleré, L.; Escudero, A.; Cacho, J.; Ferreira, V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six Premium quality Spanish aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1653-1660.
- (34) Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma. *J. Chromatogr. A* **1998**, *808*, 211-218.
- (35) Rodríguez-Bencomo, J. J.; Schneider, R.; Lepoutre, J. P.; Rigou, P. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 5640-5646.
- (36) Culleré, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Validation of an analytical method for the solid phase extraction, in cartridge derivatization and subsequent gas chromatographic-ion trap tandem mass spectrometric determination of 1-octen-3-one in wines at ng L<sup>-1</sup> level. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 51-57.
- (37) Strauss, C. R.; Wilson, B.; Anderson, R.; Williams, P. J. Development of precursors of C<sub>13</sub> nor-isoprenoid flavorants in riesling grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, *38*, 23-27.
- (38) Sumbly, K. M.; Grbin, P. R.; Jiranek, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chem.* **2010**, *121*, 1-16.

- (39) Campo, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. The chemical characterization of the aroma of dessert and sparkling white wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes, and Cava) by gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2477-2484.
- (40) Vesely, P.; Lusk, L.; Basarova, G.; Seabrooks, J.; Ryder D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6941-6944.
- (41) Azzara, C. D.; Campbell, L. B. Off-flavors of dairy products. In *Off-flavors in foods and beverages (developments in food science)*; Charalambous, G. Ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, The Netherlands, 1992; 329-374.
- (42) van Gemert, L.J. (2000). Compilations of odour threshold values in air and water. Boelens Aroma Chemical Information Service.
- (43) Cometto-Muñiz, J. E.; Abraham, M. H. Odor detection by humans of lineal aliphatic aldehydes and helional as gauged by dose-response functions. *Chem. Senses* **2010**, *35*, 289-299.

## CAPÍTULO 5

### Los pistachos tostados



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## 5.1.- LOS FRUTOS SECOS

Aunque existen escasos vestigios de la dieta seguida por nuestros primeros antepasados, se sabe que el hombre siempre ha sido omnívoro. Junto con las hojas, los brotes, las cortezas y las raíces, los homínidos consumían insectos y carroña, así como distintos frutos [1]. Yacimientos prehistóricos en Israel, con restos arqueológicos con más de 780.000 años de historia, aportan uno de los primeros indicios de la existencia de los frutos secos ya por entonces. Entre los encontrados hay especies que aún se consumen hoy en día, como el pistacho o la almendra [2, 3].

Además de contribuir a la dieta, los frutos secos están estrechamente vinculados a la cultura de las poblaciones que se han servido de ellos. De forma general, la palabra *nuez* designa a todos los frutos con una semilla comestible, la *almendra*, encerrada en una cubierta exterior dura. Las expresiones simbólicas referidas a la almendra con respecto a la cáscara se extienden a todos los frutos que contienen una semilla, y significan lo esencial escondido en lo accesorio [2]. Igualmente, también hay citas en el Antiguo Testamento de la Biblia a las almendras, los pistachos o las nueces en las que se son considerados un signo de esperanza o algo valioso.

### 5.1.1.- Definición

Los frutos secos son frutas con un bajo contenido en agua (menos del 50%) y ricas en lípidos, proteínas y oligoelementos, que consisten en un grano o semilla comestible encerrado en una cáscara que se vuelve dura tras la maduración [4].

Ciertos frutos secos, como las castañas, las avellanas o las bellotas, también pueden definirse como frutas con una sola semilla dura y comestible y cuyo pericarpio es duro e indehisciente [3]. Por *pericarpio* se entiende la parte exterior del fruto de las plantas, lo que cubre las semillas, e *indehisciente* significa que no se abre naturalmente para que salga la semilla cuando el fruto está maduro [5].



Sin embargo, esta definición no es válida para el resto de frutos secos, entre los que se encuentran las almendras, las nueces, los pistachos, las pacanas o las nueces de macadamia. En realidad, estos productos son los huesos duros de distintas drupas (frutos de mesocarpio carnoso y endocarpio leñoso con una sola semilla) [3]. Mientras que de los melocotones, por ejemplo, comemos su parte fresca (mesocarpio) y tiramos los huesos (endocarpio), en el caso de estos frutos secos, lo que desechamos son las pielecitas que constituyen su mesocarpio, comiéndonos sus huesos.

### 5.1.2.- Tipos de frutos secos

Los frutos secos más populares y de mayor cultivo, junto a los árboles que los producen y la zona de la que son originarios, se especifican en la **Tabla 5.1**.

Fruto seco	Árbol productor, nombre científico y (familia)	Zona de origen
Almendra	Almendro. <i>Prunus amygdalus</i> Batsch Sin. / <i>Prunus dulcis</i> D.A.Webb / <i>Amygdalus communis</i> L. (Rosaceae)	Centro-oeste de Asia
Anacardo	Anacardo. <i>Anacardium occidentale</i> L. (Anacardiaceae)	América del Sur
Avellana	Avellano. <i>Corylus avellana</i> L. (Corylaceae)	Asia Menor
Nuez	Nogal. <i>Juglans regia</i> L. (Juglandaceae)	Asia Central
Nuez de Brasil	Nogal de Brasil. <i>Bertholletia excelsa</i> Humb. et Bonpl. (Lecythidaceae)	Cuenca amazónica
Nuez de macadamia	Macadamia. <i>Macadamia integrifolia</i> Maiden et Betche / <i>Macadamia tetraphylla</i> L.A.S. Johnson (Proteaceae)	Australia
Pacana	Pacana. <i>Carya illinoensis</i> (Wang.) K. Koch (Juglandaceae)	Cuenca del Misisipi
Piñón	Pino piñonero. <i>Pinus pinea</i> L. (Pinaceae)	Cuenca mediterránea
Pistacho	Pistachero. <i>Pistacia vera</i> L. (Anacardiaceae)	Centro-oeste de Asia

**Tabla 5.1.** Nombre y procedencia de los frutos secos más populares [6]

Las características físicas, químicas y nutritivas de todos estos frutos secos son similares, al igual que los procesos de recolección, cosecha, procesado y

comercialización. Sin embargo, los árboles que los producen sí requieren diferentes condiciones climáticas. Los almendros, avellanos, nogales, pacanas, pinos piñoneros y pistachos precisan climas mediterráneos, mientras que los anacardos, macadamias y nogales del Brasil necesitan climas más cálidos. El almendro, el pino piñonero y el pistachero destacan por su tolerancia a la sequía. En cambio, el anacardo, la macadamia y el nogal de Brasil son propios de las zonas húmedas. Y mientras que almendros, avellanos, macadamias, nogales, pacanas y pistacheros se cultivan en plantaciones, los pinos piñoneros y los nogales de Brasil lo hacen en bosques. Los anacardos se encuentran tanto en plantaciones regulares como de forma silvestre [6].

Otros frutos secos comestibles son las castañas, las bellotas y los cocos. Los cacahuetes, sin embargo, no lo son, ya que proceden de una planta leguminosa. Pero, dado que presentan un perfil nutricional semejante al de los frutos secos, son habitual y mundialmente considerados como tales [4].

En función de su presentación, los frutos secos se clasifican en [7]:

- *Frutos secos con cáscara*. Son los que se presentan con su cáscara, tal como han sido recolectados, como las nueces, las avellanas, las almendras o los pistachos con cáscara.
- *Frutos secos en grano*. Son los productos que resultan tras extraer la cáscara.
- *Frutos secos repelados*. Son productos en grano, pero sin la piel superficial, debido a que se aplica un proceso de pelado, como ocurre con los piñones, las avellanas o las almendras repeladas.

### **5.1.3.- Procesado de los frutos secos**

Los frutos secos crudos presentan un bajo contenido en humedad relativa, por lo que no es necesario consumirlos tras la cosecha. Además, si la recolección se ha realizado de manera adecuada y en condiciones óptimas, pueden conservarse hasta 9-12 meses con buenas cualidades organolépticas y nutricionales.

Antes de su comercialización, los frutos secos son sometidos a uno o varios de los procesos siguientes: limpieza, clasificación, calibrado, descascarillado, secado, tostado, pelado, repelado, frito o salado [7]. De manera que encontramos:

- *Frutos secos crudos*. No se les ha aplicado ningún proceso tecnológico de elaboración. Es lo que ocurre con las nueces, que suelen presentarse enteras y crudas. Algunos frutos secos crudos pueden sufrir un proceso de elaboración (laminado, paliteado, granillado, molturación) que afecte a su forma de presentación.
- *Frutos secos tostados*. En este caso, se les somete a un proceso de tostado, que puede incluir la adición de sal, caso de las avellanas, los pistachos y las almendras.
- *Frutos secos fritos*. Se les somete a un proceso de fritura en aceite vegetal, generalmente acompañado de la adición de sal. En algunos casos, la fritura se acompaña con miel.

#### **5.1.3.1.- Recolección**

Una buena recolección es el primer paso para obtener frutos secos con una calidad organoléptica y nutricional adecuada. La cáscara del fruto debe estar entera, seca y limpia, y debe presentar su color característico y sin ennegrecimiento. Al romper la cáscara, el grano debe aparecer bien desarrollado, limpio y sin olores ni sabores extraños, además de estar sano (sin insectos, mohos o podredumbre) [7].

Para que la recolección no condicione negativamente la vida posterior del producto, debe evitarse un contacto inadecuado con el suelo, así como los golpes y las lesiones de los frutos, con el objetivo de que no puedan penetrar los insectos y los microorganismos, al igual que la humedad [7].

La recolección puede hacerse de forma manual o mecánica, en función del tipo de fruto seco o de la zona de producción. Es el caso de las almendras y de las nueces,

que en la cuenca mediterránea suelen recolectarse a mano, mientras que en Estados Unidos se emplean cosechadoras mecánicas que agitan los árboles para hacer caer los frutos maduros al suelo, de donde se recogen posteriormente [8, 9]. Los pistachos también se recolectan con máquinas, aunque a veces, sobre todo si se trata de árboles jóvenes, el proceso se realiza a mano [10]. En cambio, las nueces de macadamia, las de Brasil, los anacardos y las avellanas se dejan caer al suelo una vez maduras, de donde son recogidas manual o mecánicamente de forma periódica [8-10]. Por su parte, la recolección de los piñones es artesanal y, o bien se cortan las piñas verdes que los contienen, se dejan secar al sol y se extraen los piñones, o bien se recogen los frutos de debajo de los pinos piñoneros [10].

### **5.1.3.2.- Conservación**

Una vez recolectados los frutos secos es muy importante someterlos inmediatamente a unas buenas condiciones de conservación, para reducir las posibilidades de contaminación por hongos o insectos. En primer lugar, hay que secarlos rápidamente hasta humedades relativas inferiores al 5-6%. Luego, conservarlos en lugares frescos y secos, con temperaturas de refrigeración entre los 6 y los 10 °C, una humedad relativa inferior al 60% y una buena ventilación [7].

De este modo es posible conservar los frutos secos entre 9 y 12 meses, un período de tiempo similar al que transcurre entre cada cosecha anual. Pero este tiempo depende del tipo de producto. Sin embargo, en ningún caso es aconsejable prolongarlo, ya que su alto contenido en ácidos grasos predispone al enranciamiento. De hecho, las nueces se enrancian con mayor rapidez que otros frutos secos por su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados [9-11].

Uno de los procesos recomendados para mejorar la conservación de los frutos crudos, al igual que antes de envasarlos a granel y sin elaborar, es la fumigación. Así se evita su insectación. Y aunque los productos aplicados son muy tóxicos para los insectos, no modifican ni las propiedades organolépticas ni nutricionales de los frutos

secos [7]. Pero desde hace unos años se está probando con buenos resultados la irradiación con rayos  $\gamma$  y como una alternativa a la fumigación [12, 13], ya que tampoco altera las propiedades de los productos y se elimina el riesgo que supone la manipulación de los insecticidas.

### **5.1.3.3.- Elaboración**

Tras la recolección y los procesos de limpieza y clasificación, a algunos frutos secos, caso de las almendras, los anacardos, las avellanas, las pacanas o los piñones, se les quita la cáscara. Otros frutos, como los distintos tipos de nueces o los pistachos, pueden ser descascarillados o no [8].

Parte de la producción de frutos secos se consume sin que previamente se les aplique ningún otro tratamiento adicional (avellanas, nueces, pacanas y nueces de Brasil), mientras que otra parte de la producción puede consumirse, o bien cruda, o bien tras haber sido tostada y salada (anacardos). Los piñones y las almendras suelen tostarse, mientras que es habitual que las nueces de macadamia se fríen y salen. En cuanto a los pistachos, lo normal es tostarlos y salarlos, tanto si se les ha quitado la cáscara como si no [8-11].

En cualquier caso, los procesos de elaboración a los que se les somete implican aplicar calor, ya que se trata de un tostado o una fritura. Ambos reducen la humedad relativa del fruto seco a valores próximos al 2% y favorecen su conservación, además de eliminar microorganismos e insectos. El tostado se realiza aplicando aire caliente ( $\approx 150$  °C) sobre el producto, o bien combinando aire caliente y una superficie de contacto en movimiento a alta temperatura (convección-conducción). La fritura se lleva a cabo sumergiendo el fruto seco en un aceite vegetal a una temperatura cercana a los 150 °C [14]. Los dos procesos pueden ir acompañados de un salado y, en el caso de la fritura, también de un proceso de caramelización o de adición de miel o similares [7]. La adición final de sal también favorece la conservación del fruto seco, ya que inhibe el crecimiento de mohos.

Gracias al tostado, los frutos secos desarrollan una textura crujiente y un color tostado, a la vez que numerosos aromas. Además, disminuye su contenido en azúcares por las reacciones de pardeamiento que se producen, que incluyen reacciones de caramelización y las reacciones de Maillard. También pueden desnaturalizarse algunas proteínas, aunque sin que disminuya sensiblemente su valor nutritivo. Sin embargo, mientras que las vitaminas B<sub>2</sub> (riboflavina) y B<sub>3</sub> (niacina) se conservan bien, se destruye un alto porcentaje de B<sub>1</sub> (tiamina) [14].

En la fritura, parte del aceite empleado queda impregnado en el alimento, con lo que le termina aportando sus componentes nutricionales y su aroma, a la vez que parte de la fracción grasa del alimento se funde e incorpora al aceite de fritura. Este proceso es más agresivo que el tostado y provoca una desnaturalización de las proteínas, un pardeamiento químico, y una destrucción de vitaminas y antioxidantes [14]. Debido a esta pérdida de antioxidantes, y dado que el alto contenido en ácidos grasos de los frutos secos da problemas de enranciamiento, es habitual añadir un antioxidante durante la fritura [7].

#### **5.1.3.4.- Envasado**

El envasado debe identificar el producto y conservarlo adecuadamente para que presente unas condiciones óptimas a lo largo de toda su vida útil [14]. Los envases que contienen los frutos secos deben protegerlos frente a contaminaciones físicas, químicas o biológicas y frente a alteraciones del color, el olor, el sabor o la textura, al mismo tiempo que deben impedir la entrada de oxígeno o humedad [7].

Además, el almacenamiento de los frutos secos tras su envasado constituye una parte muy importante de su proceso de obtención y elaboración, ya que las condiciones en las que se realiza inciden directamente sobre la calidad del producto que llega al consumidor. Para ello es necesario frenar la actuación de los factores que favorecen dicha oxidación, como son la presencia de oxígeno, la exposición a la luz o temperaturas elevadas, o los bajos niveles de antioxidantes naturales.

En este sentido, existen diversos estudios en los que se ha analizado el efecto que distintas condiciones de almacenamiento y diferentes materiales de envasado ejercen sobre la calidad de los frutos secos [15, 16]. Así, se ha demostrado que la temperatura es el principal factor implicado en la oxidación, seguido por la presencia de oxígeno y la luz [15]. En cuanto a las atmósferas protectoras (aquéllas en las que el oxígeno del envase ha sido sustituido por otros gases, como nitrógeno, argón o helio), sí son eficaces frente a la oxidación, pero son aún más eficaces ciertos materiales capaces de absorber oxígeno [16].

De forma general, los materiales de envasado que se utilizan son el metal, el vidrio o el plástico. Los tarros de vidrio permiten aplicar el vacío, con lo que se incrementa el potencial de conservación. Las latas metálicas cierran herméticamente, protegen totalmente de la luz y además permiten añadir atmósferas protectoras. Por su parte, los plásticos constituyen buenos materiales de envasado, ya que, además de ser flexibles, ligeros y resistentes, pueden proteger de la luz (si llevan una capa plástica de aluminio) y también permiten añadir atmósferas protectoras.

#### **5.1.4.- Composición química**

Todos los frutos secos se caracterizan por un alto valor energético. Esto se debe al elevado porcentaje de lípidos de su composición, que oscila entre el 26% para el coco y el 75% para las nueces de macadamia. Además, los ácidos grasos que constituyen estos lípidos son mayoritariamente monoinsaturados, entre los que destaca el ácido oleico, aunque también es importante la cantidad de poliinsaturados, principalmente de ácido linoleico [17, 18].

También el contenido proteico de los frutos secos es relativamente alto, ya que, en algunos casos (pistachos y almendras) llega hasta los 20 g/100 g. Sin embargo, el patrón de aminoácidos proporcionado por los frutos secos no es óptimo, al presentar deficiencias respecto a algunos aminoácidos esenciales como la lisina, el triptófano, la metionina y la cisteína [17, 18].

Respecto a los hidratos de carbono, las cantidades en las que aparecen se asemejan a las de las proteínas. Oscilan entre un 12% para las nueces y un 62% para las castañas, y la sacarosa es el azúcar mayoritario (>95% del total de los azúcares). A diferencia de otros productos vegetales, apenas contienen almidón, aunque son especialmente ricos en fibra insoluble [17, 18].

En cuanto a las vitaminas y los minerales, los frutos secos son buenas fuentes de estos micronutrientes. Especialmente importante es el aporte de vitaminas del grupo B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>), vitamina E y vitamina K que proporcionan, así como de ciertos minerales: Mn, Mg, P y K. Además, las nueces de macadamia destacan por su riqueza en Se, los piñones, en Zn, y las almendras y los anacardos, en Ca y Fe, respectivamente [17].

Por último, los frutos secos, sobre todo las pacanas, las nueces y los pistachos, presentan cantidades importantes de distintos compuestos fenólicos [19, 20], con numerosos y beneficiosos efectos antioxidantes [17].

Pero el contenido de estos componentes químicos varía enormemente en función del tipo de fruto seco que se considere [21, 22]. Y no sólo eso: también existen notables diferencias según la variedad [23, 24], la zona de producción [25, 26] o las condiciones de cultivo y recolección [27].

### **5.1.5.- Efectos funcionales de los frutos secos**

Tal y como se ha visto en apartados anteriores, los frutos secos constituyen una buena e importante fuente de energía, ricos en lípidos y proteínas y con una gran variedad de micronutrientes, por lo que se han consumido desde la prehistoria. Pero, además, y debido a su composición, estudios actuales han demostrado que estos productos también pueden ser considerados alimentos funcionales naturales, capaces de prevenir diferentes enfermedades crónicas. De hecho, las dietas seguidas en ciertas zonas, en las que los frutos secos ocupan un lugar destacado, como ocurre con



la dieta mediterránea, se han revelado patrones alimenticios que favorecen la salud de quienes los siguen [28, 29].

El consumo habitual de frutos secos está relacionado con un descenso en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, la obesidad y la diabetes, al igual que con la reducción del colesterol, al mismo tiempo que ayudan a prevenir ciertas enfermedades degenerativas del mundo civilizado [30, 31].

Los responsables de estos numerosos efectos beneficiosos son varios. En primer lugar, los ácidos grasos mono y poliinsaturados del perfil lipídico de los frutos secos, que reducen los factores de riesgo cardiovascular al disminuir el contenido de colesterol en sangre [32]. Estos compuestos, junto con los fenoles, que presentan actividades antioxidantes, son los responsables de la inhibición de los fenómenos de oxidación, directamente relacionados con ciertos tipos de cáncer [33]. Por su parte, el alto contenido en fibra alimentaria de los frutos secos ayuda a mejorar el tránsito intestinal y mantiene la sensación de saciedad, lo que afecta al peso corporal, a la vez que favorece el control del metabolismo de la glucosa, con una acción clara sobre la sensibilidad a la insulina [34].

## 5.2.- LOS PISTACHOS

Los pistachos son los frutos del árbol denominado alfóncigo o árbol pistachero. Su parte comestible es la semilla, que es de color amarillo o verde. Pertenece a la familia Anacardiaceae, la misma del anacardo o el mango. Dentro del género *Pistacia* L., que comprende 9 especies y 5 subespecies diferentes [35], sólo la especie *P. vera* proporciona frutos comestibles [3].

Originario de las zonas desérticas de Asia central y Oriente Próximo, donde ya se cultivaba en el 10.000 a. C., el pistachero se introdujo poco a poco en los países mediterráneos, de donde se exportó en el siglo XIX a los Estados Unidos. Sin embargo,

no fue hasta los años 70 del siglo pasado cuando los estadounidenses lo empezaron a cultivar masivamente [2, 9]. Actualmente, la República Islámica de Irán es el mayor productor mundial de pistachos, con una producción anual de casi 200.000 toneladas en el 2008, seguido de los EE.UU. y Turquía [36]. Siempre se comercializa con la cáscara, tostado y salado, y principalmente se emplea en la elaboración de helados y confitería, aunque también se consume como aperitivo.

Los pistachos se caracterizan por ser los menos calóricos de todos los frutos secos, con 577 kcal/100 g de producto seco, a la vez que presentan el mayor contenido proteico (alrededor de 20 g/100 g) y, además, con un importante aporte de lisina. Respecto al resto de frutos secos, su contenido en hidratos de carbono también es alto (entorno al 28%), al igual que su contenido en vitaminas A y B<sub>6</sub> [17, 18].

Como ocurre para los demás frutos secos, los pistachos también presentan una diferente composición química en función de la variedad de que se trate [24, 37]. De este modo, distintos estudios realizados sobre la composición de los pistachos han permitido clasificar las muestras analizadas según su origen [38, 39] o variedad [40].

Por último, además de los efectos funcionales beneficiosos de las semillas de los pistachos (por ser un fruto seco) [30, 41], también hay que considerar algunas otras propiedades que tienen otros productos producidos por el árbol pistachero. Es el caso de la actividad antimicrobiana que presentan los aceites esenciales obtenidos a partir de su resina [42], o las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales obtenidos de sus hojas [43].

### **5.3.- EL AROMA DE LOS PISTACHOS TOSTADOS**

Los frutos secos crudos, sin tostar o freír, no destacan por tener un aroma especialmente intenso. En cambio, todos los frutos secos tostados presentan un olor característico y fácilmente identificable [44].

El proceso del tostado genera numerosos compuestos volátiles, principalmente a través de tres reacciones: la reacción de Maillard y su asociada, la degradación de Strecker de los aminoácidos, la caramelización de los azúcares, y la degradación de los lípidos, que incluye las reacciones térmicas (pirólisis) y las oxidativas. Gracias a las dos primeras reacciones se producen pirazinas, piridinas, pirroles, furanos y los aldehídos de Strecker, entre otros muchos compuestos, mientras que la caramelización es la responsable de la aparición de los derivados del furano y el maltol. Todos estos compuestos resultantes aportan al producto final sus aromas, colores y sabores característicos. Por su parte, y aunque la degradación de los lípidos suele asociarse con la formación de notas aromáticas desagradables, también propicia la aparición de algunos aldehídos y cetonas que proporcionan notas dulces y afrutadas [44].

Existen varios estudios en los que se ha analizado la composición volátil de distintos frutos secos, tanto crudos como tostados [45-48]. También se ha investigado el efecto que este tostado tiene sobre el aroma de los frutos secos, para lo que se han comparado las fracciones volátiles y aromáticas de los productos tostados y sin tostar [49, 50]. De esta forma, y de una u otra manera, el aroma de las nueces, las avellanas, las almendras, las castañas, las pacanas, las nueces de Brasil y las de macadamia ya ha sido estudiado [44-50].

Sin embargo, no existen estudios sobre el aroma de los piñones, y únicamente hay un trabajo de 1975 en el que se analizan los volátiles de las nueces de macadamia [51]. Del mismo modo que, hasta el desarrollo de la parte experimental que ha dado lugar esta tesis doctoral, sólo había un trabajo sobre los compuestos volátiles de los pistachos tostados [52], aunque la información que proporciona este estudio de 1981 es bastante incompleta.

Así, a pesar de que los autores de dicho estudio identifican una serie de compuestos (mediante espectrometría de masas y/o tiempos de retención), en verdad no pueden establecer la importancia que esos compuestos tienen en el aroma global de los pistachos tostados, ya que no trabajan con la cromatografía de gases-

olfatometría. Se limitan a relacionarlos con odorantes previamente identificados en otros productos tostados y que se cree que contribuyen al aroma “tostado”.

Además, también debe señalarse que el extracto aromático obtenido se manipula de distintas maneras para poder ser analizado, según un procedimiento publicado en 1974 [53]. Pero en ningún momento se comprueba que realmente sea representativo del aroma de los pistachos.

Por lo tanto, y dado el vacío existente en este campo y el interés que el aroma de este producto suscita en la elaboración de distintos alimentos manufacturados que se emplean en pastelería y confitería, se decidió iniciar la investigación del aroma de los pistachos tostados en profundidad. En principio, estudiando dos técnicas distintas de extracción y concentración de volátiles, la microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza (HS-SPME) y la extracción directa con disolventes (DSE) seguida de *high-vacuum transfer* (HVT). El objetivo era averiguar cuál de las dos proporcionaba extractos representativos de la muestra, o si ambas lo hacían. Y, aunque el estudio confirmó este segundo supuesto, la HS-SPME demostró que presentaba una mejor repetitividad y reproducibilidad. Además, comparando los resultados olfatométricos obtenidos para ambas técnicas, se pudo comprobar que la HS-SPME también permitía una mayor extracción de compuestos aromáticos.

Toda esta información dio lugar al primer artículo que se adjunta al final de este capítulo, titulado *“Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachio aroma”* y que ha sido publicado en la revista *Journal of Chromatography A* [54].

Asimismo, estas investigaciones dieron pie al desarrollo del segundo artículo de este capítulo, aceptado para su publicación en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [55] en el momento de redactar esta tesis doctoral, y cuyo título es

*“Determination of roasted pistachios (Pistacia vera L.) key odorants by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry”.*

En este segundo artículo se procedió a caracterizar el perfil aromático de dos variedades distintas de estos pistachos, utilizando la HS-SPME como técnica de obtención de extractos aromáticos representativos. La técnica olfatométrica aplicada, el *Aroma Extract Dilution Analysis* (AEDA), permitió comprobar que la variedad *Fandooghi* presentaba un perfil aromático más rico que la otra variedad, la *Kerman*, lo que además concordaba con los resultados obtenidos del análisis descriptivo sensorial.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Carbonell Roura, E., Pastó Marín, I. Plantas, frutos secos y evolución de los homínidos. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 55-64.
- [2] Solà Alberich, R., Anglès Soronellas. Historia, simbolismo y citas bíblicas de los frutos secos. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 65-76.
- [3] Rosengarten, F., Jr. *The book of edible nuts*. New York: Dover Publications, Inc.; 2004.
- [4] Alasalvar, C., Shahidi, F. Tree nuts: composition, phytochemicals, and health effects: an overview. En: Alasalvar, C., Shahidi, F., editors. *Tree nuts. Composition, phytochemicals, and health effects*. Boca Raton: CRC Press; 2009, p. 1-10.
- [5] Rae.es, Real Academia Española [Internet]. Madrid: Rae.es; [acceso 19 de enero de 2011]. Disponible en: <http://www.rae.es>.
- [6] Vargas García, F. J. Árboles productores de frutos secos. Origen, distribución, descripción y producción. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 21-54.
- [7] Vilardell Cera, J., Fortuny Queralt, J. Poscosecha de los frutos secos. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 97-106.
- [8] Ensminger, A. H., Ensminger, M. E., Konlande, J. E., Robson, J. R. K. *Foods & Nutrition encyclopedia*. Volume 2. 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton: CRC Press; 1994.
- [9] Kearney, P. Nuts. En: Francis, F. J., editor. *Wiley encyclopedia of food science and technology*. Volume 4. 2<sup>nd</sup> edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2000, p. 2676-2690.
- [10] Stephenson, R. A. Nuts. En: Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M., editors. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Volume seven. 2<sup>nd</sup> edition. Amsterdam: Academic Press; 2003, p. 4205-4212.
- [11] Styles, B. T. Pine kernels. En: Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Volume seven. 2<sup>nd</sup> edition. Amsterdam: Academic Press; 2003, p. 4575-4578.
- [12] Mexis, S. F., Kontominas, M. G. Effect of gamma irradiation on the physico-chemical and sensory properties of raw shelled peanuts (*Arachis hypogaea* L.) and pistachios nuts (*Pistacia vera* L.). *J. Sci. Food Agric*. 2009; 89: 867-875.

- [13] Al-Bachir, M. Effect of gamma irradiation on fungal load, chemical and sensory characteristics of walnuts (*Juglans regia* L.). *J. Stored Prod. Res.* 2004; 40: 355-362.
- [14] Aleixandre Benavent, J. L. *Conservación de alimentos*. Valencia: Servicio de Publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia; 1997.
- [15] Mexis, S. F., Badeka, A. V., Riganakos, K. A., Karakostas, K. X., Kontominas, M. G. Effect of packaging and storage conditions on quality of shelled walnuts. *Food Control* 2009; 20: 743-751.
- [16] Jensen, P. N., Sørensen, G., Brockhoff, P., Bertelsen, G. Investigation of packaging systems for shelled walnuts based on oxygen absorbers. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4941-4947.
- [17] Sathe, S. K., Monaghan, E. K., Kshirsagar, H. H., Venkatachalam, M. Chemical composition of edible nut seeds and its implications in human health. En: Alasalvar, C., Shahidi, F., editors. *Tree nuts. Composition, phytochemicals, and health effects*. Boca Raton: CRC Press; 2009, p. 11-35.
- [18] Rafecas Martínez, M., Boatella Riera, J. Los frutos secos: fuentes de energía y macronutrientes. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 129-143.
- [19] Kornsteiner, M., Wagner, K.-H., Elmadfa, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem.* 2006; 98: 381-387.
- [20] Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., O'Brien, N. M. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2004; 55: 171-178.
- [21] Venkatachalam, M., Sathe, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 4705-4714.
- [22] Moodley, R., Kindness, A., Jonnalagadda, S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *J. Environm. Sci. Health Part B* 2007; 42: 585-591.
- [23] Ruggeri, S., Cappelloni, M., Gambelli, L., Nicoli, S., Carnovale, E. Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital. J. Food Sci.* 1998; 10: 243-252.
- [24] Küçüköner, E., Yurt, B. Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *Eur. Food Res. Technol.* 2003; 217: 308-310.
- [25] García-López, C., Grané-Teruel, N., Berenguer-Navarro, V., García-García, J. E., Martín-Carratalá, M. L. Major fatty acid composition of 19 almond cultivars of different origins. A chemometric approach. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 1751-1755.

- [26] Evaristo, I., Batista, D., Correia, I., Correia, P., Costa, R. Chemical profiling of Portuguese *Pinus pinea* L. nuts. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90: 1041-1049.
- [27] Nanos, G. D., Kazantzis, I., Kefalas, P., Petrakis, C., Stavroulakis, G. G. Irrigation and harvest time affect almond kernel quality and composition. *Sci. Hortic.* 2002; 96: 249-256.
- [28] Lois, M. T. A.-E., García-Andrade, C. R., Walther, L. A. Á.-S., Núñez-Cortés, J. M. The Mediterranean diet: a combination of beneficial elements for cardiovascular disease. *Curr. Nutr. Food Sci.* 2010; 6: 105-106.
- [29] Vernaglion, L. The Mediterranean diet: a matter of history, tradition, culture and health. *J. Nephrol.* 2009; 22: 149-158.
- [30] Ternus, M. E., Lapsley, K., Geiger, C. J. Health benefits of tree nuts. En: Alasalvar, C., Shahidi, F., editors. *Tree nuts. Composition, phytochemicals, and health effects*. Boca Raton: CRC Press; 2009, p. 37-64.
- [31] Coates, A. M., Howe, P. R. C. Edible nuts and metabolic health. *Curr. Opin. Lipidol.* 2007; 18: 25-30.
- [32] Mataix Verdú, J., Ros Rahola, E. Composición en ácidos grasos de los frutos secos: implicaciones para la salud. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 145-156.
- [33] Blomhoff, R. Antioxidantes y frutos secos: importancia en la prevención de las enfermedades crónicas. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 177-199.
- [34] Salas-Salvadó, J., García-Lorda, P., Ros Rahola, E. Fibra, frutos secos y enfermedades cardiovasculares. En: Salas-Salvadó, J., Ros Rahola, E., Sabaté Casellas, J., editores. *Frutos secos, salud y cultura mediterráneas*. Barcelona: Editorial Glosa, S. L.; 2005, p. 157-175.
- [35] AL-Saghir, M. G. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) based on morphological data. *Asian J. Plant. Sci.* 2010; 9: 28-35.
- [36] Fao.org, Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. Roma: Fao.org; [acceso 19 de enero de 2011]. Disponible en: <http://faostat.fao.org>.
- [37] Tsantili, E., Takidelli, C., Christopoulos, M. V., Lambrinea, E., Rouskas, D., Roussos, P. A. Physical, compositional and sensory differences in nuts among pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties. *Sci. Hortic.* 2010; 125: 562-568.



- [38] Anderson, K. A., Smith, B. W. Use of chemical profiling to differentiate geographic growing origin of raw pistachios. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 410-418.
- [39] Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., Maccarone, E. Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chem.* 2007; 104: 403-408.
- [40] Chahed, T., Bellila, A., Dhifi, W., Hamrouni, I., M'hamdi, B., Kchouk, M. E., Marzouk, B. Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects. *Grasas Aceites* 2008; 59: 51-56.
- [41] Gentile, C., Tesoriere, L., Butera, D., Fazzari, M., Monastero, M., Allegra, M., Livrea, M. A. Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 643-648.
- [42] Alma, M. H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Digrak, M., Efe, F. T., Yilmaz, N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 3911-3914.
- [43] Duru, M. E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harmandar, M., Izumi, S., Hirata, T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* 2003; 74: 170-176.
- [44] Cadwallader, K. R., Puangpraphant, S. Flavor and volatile compounds in tree nuts. En: Alasalvar, C., Shahidi, F., editors. *Tree nuts. Composition, phytochemicals, and health effects*. Boca Raton: CRC Press; 2009, p. 109-125.
- [45] Elmore, J. S., Nisyrios, I., Mottram, D. S. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.). *Flavour Fragr. J.* 2005; 20: 501-506.
- [46] Alasalvar, C., Odabasi, A. Z., Demir, N., Balaban, M. Ö., Shahidi, F., Cadwallader, K. R. Volatiles and flavor of five Turkish hazelnut varieties as evaluated by descriptive sensory analysis, electronic nose, and dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry. *J. Food Sci.* 2004; 69: 99-106.
- [47] Takei, Y., Yamanishi, T. Flavor components of roasted almond. *Agric. Biol. Chem.* 1974; 38: 2329-2336.
- [48] Krist, S., Unterweger, H., Bandion, F., Buchbauer, G. Volatile compound analysis of SPME headspace and extract samples from roasted Italian chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) using GC-MS. *Eur. Food Res. Technol.* 2004; 219: 470-473.

- [49] Alasalvar, C., Shahidi, F., Cadwallader, K. R. Comparison of natural and roasted Turkish Tumbul hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavor by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 5067-5072.
- [50] Burdack-Freitag, A., Schieberle, P. Changes in the key odorants of Italian hazelnuts (*Corylus avellana* L. Var. Tonda Romana) induced by roasting. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 6351-6359.
- [51] Crain, Jr., W. O., Tang, C. S. A research note: volatile components of roasted macadamia nuts. *J. Food Sci.* 1975; 40: 207-208.
- [52] Mervat, M., Soliman, A., Osman, F., El-Sawy, A. Volatile components of roasted pistachio-nut. *Agric. Biol. Chem.* 1981; 45: 2123-2125.
- [53] Takei, Y., Shimada, K., Watanabe, S., Yamanishi, T. Volatile components of roasted almonds: basic fraction. *Agric. Biol. Chem.* 1974; 38: 645-648.
- [54] Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., Mestres, M. Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachio aroma. *J. Chromatogr. A* 2010; 1217: 7781-7787.
- [55] Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., Mestres, M. Determination of roasted pistachios (*Pistacia vera* L.) key odorants by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry. *J. Agric. Food Chem.* 2011, DOI: 10.1021/jf104496u.

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

*Comparative study of two extraction techniques to obtain representative  
aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry:  
application to roasted pistachio aroma*

**Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 7781-7787**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA

Laura Aceña Muñoz

ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

**Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma  
extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: Application to roasted  
pistachio aroma**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres

Research Group of Analytical Chemistry of Wine and Food  
Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry  
Campus Sescelades. Faculty of Oenology of Tarragona  
Rovira i Virgili University. 43007 Tarragona (Spain)

**ABSTRACT**

This research paper presents a comparative study of two different extraction and concentration techniques to obtain representative pistachio aroma extracts: the traditional direct solvent extraction (DSE) followed by high-vacuum transfer (HVT) and the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The results showed that, although both techniques provide accurate information about the aromatic composition that will be perceived by the consumer, the precision in terms of within-day repeatability and between-days repeatability (intermediate precision) of the chromatographic areas presented better values for HS-SPME than for DSE-HVT. Moreover the solvent-free HS-SPME allows the extraction of more odour-active regions, requires very little sample handling and shorter time for sampling.

**KEYWORDS:** Pistachio nuts; aroma; Direct Solvent Extraction-High Vacuum Transfer; Headspace-Solid Phase Micro-Extraction; Gas Chromatography-Olfactometry

## 1. INTRODUCTION

Edible nuts have been widely used since ancient times as an important source of nutrients such as proteins, vitamins, minerals and lipids (mainly mono and polyunsaturated fatty acids) [1, 2].

As in any other food product, nuts quality is closely related to the flavour and the aroma detected by consumers will have a great influence on the acceptance or rejection of the nut evaluated. However, it has to be said that raw nuts have a rather bland aroma, being some compounds generated during the roasting process responsible for the characteristic nut odour [3-6]. Due to the importance of nuts on human diet and health [7, 8] there are several studies published on their chemical [2, 9-12] and volatile composition [13-15] for both raw and roasted nuts. Nevertheless, only a few studies related to their aromatic fraction [3-6, 13-15] have been carried out and, for some nuts, such pistachios, there has not been published any study about the compounds responsible for its aroma.

The aroma of any foodstuff is influenced by the action of hundreds of different and very heterogeneous chemicals (alcohols, aldehydes, esters, ketones, pirazines, acids, terpenes, etc.) each of them with a different contribution to the whole aroma [16]. Every odorant must be volatile in order to reach the nose and interact with the appropriate receptors located on the olfactory epithelium [17], but not all the components of the volatile fraction are odour-active.

Gas chromatography-olfactometry (GCO) is a powerful technique in food aroma characterization [18, 19] that uses the human nose as a chromatographic detector in parallel with a conventional one, like the Flame Ionic Detector (FID) or the Mass Spectra Detector (MSD). Therefore, this technique allows distinguishing the odour-active compounds within the whole range of volatiles present in a particular product. Several techniques have been developed to collect and process GCO data in order to evaluate the sensory contribution of each odorant to the sample aroma [18]. Aroma extract dilution analysis (AEDA) is one of the most commonly used to determine the relative odour potency of those aromatic compounds present in a sample extract [20, 21]. This technique involves stepwise dilution of the aroma extract followed by an evaluation of each dilution by GCO until no odorants are perceived in the GCO effluent. The last dilution step where an odorant is perceived constitutes its flavour dilution (FD) factor, which can be considered a good indicator of the odour potency of that compound (i.e. the higher the FD factor, the higher the sensory contribution of that compound to the sample). In that way, AEDA is a valuable screening tool for ranking odour-active compounds in a sample according to their relative odour potency.

But obtaining reliable data in aroma characterization depends on the representativeness of the extract itself. Indeed, several studies show the large influence of the extraction method employed on the results of the olfactometric analyses performed [22], because the extract not only should

contain all the sample odorants, but also their relative amounts should remain constant. Nowadays, to obtain a representative extract is still a challenge in most foodstuffs, where their aroma are due to complex mixtures of hundreds of compounds with different chemical properties and, moreover, present at different levels of concentration, ranging from several  $\text{mg L}^{-1}$  to a few  $\text{ng L}^{-1}$ . Different sampling techniques, such as liquid-liquid extraction, solid-liquid extraction, distillation, headspace techniques, solid-phase microextraction, demixing, etc. [23-30] have been used to obtain extracts for aroma characterization.

The purpose of this paper was to make a comparative study of two different extraction and concentration techniques to obtain representative pistachio aroma extracts: the direct solvent extraction (DSE) followed by high-vacuum transfer (HVT) [26, 31] and the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) [32]. The first technique has been widely used as sample preparation technique on the characterization of many foods but it implies multiple steps in sample handling, it is time-consuming, and, as it employs organic solvents, it is unfriendly with the environment and it can also generate artifacts that will interfere in aroma detection. However, once the extract is obtained it is very easy to proceed with the AEDA analysis. On the other hand, the SPME is a newer solvent-free technique much faster because it carries out the extraction and concentration in a single step, and that requires very little sample manipulation. However, there is an important drawback when dealing with the AEDA because, as the analytes are retained on the fibre and no physical extract is obtained, it is necessary to stepwise dilute each sample before carrying out the extraction for each dilution [27].

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Samples

The samples used in this study were Iranian pistachio nuts of the variety "Fandooghi". Shell-free nuts from the 2008 harvest were roasted at 160 °C for 20 minutes and immediately vacuum-packed (bags of 250 g) in order to use fresh pistachios batches for every analysis.

### 2.2. Reagents and chemicals

The chemical standards of the aroma compounds, whose CAS numbers are specified in **Table 2**, were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), Fluka (Madrid, Spain) and Lancaster (Bischheim, France) and their purity was above 90%. Dichloromethane, diethyl ether, hexane and sodium



chloride were of analytical grade and purchased from Scharlab (Barcelona, Spain), while pure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, USA).

### 2.3. SPME

The SPME holder for manual sampling and the polydimethylsiloxane (PDMS) 100  $\mu\text{m}$ , polyacrilate (PA) 85  $\mu\text{m}$ , Carboxen-Polydimethylsiloxane (Carboxen/PDMS) 75  $\mu\text{m}$  and StableFlex Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30  $\mu\text{m}$  fibres used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). All the fibres were conditioned before use and thermally cleaned between analyses by inserting them into the GC injector port at the temperature recommended by the producer.

### 2.4. Isolation and concentration of the volatile compounds

#### 2.4.1. Direct solvent extraction (DSE) followed by high-vacuum transfer (HVT)

To obtain the extract, 100 g of fresh roasted pistachios finely ground in a coffee mill and passed through a sieve (1.5 mm of diameter) were extracted with 100 mL of dichloromethane for 5 hours at 25 °C under constant magnetic stirring and nitrogen atmosphere. Then, the mixture was filtered (paper Whatman® 42) using a water jet filter pump. The liquid phase obtained containing the volatiles and large amounts of lipids, was subjected to a high-vacuum transfer (HVT) [26], in order to isolate the volatile fraction. To proceed with the HVT, the liquid phase was slowly dropped into the distillation flask, which was heated to 36 °C. When the addition was finished, distillation was continued for 30 min. The vacuum used in the apparatus was of  $\approx 5$  mPa and the distillate was condensed in the first of the two cooling traps employed. The condensate was finally concentrated to 0.5 mL by means of a Vigreux column and a thermostatic bath at 42 °C. 2  $\mu\text{L}$  of this extract were used for GCO analysis.

#### 2.4.2. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

To extract the volatiles, 15 g of fresh roasted pistachios finely ground in a coffee mill and passed through a sieve (1.5 mm of diameter) were placed into a 50 mL glass vial together with 15 mL of Milli-Q water and a magnetic stir bar, being the sample/headspace ratio 1:1. After tightly capping the vial with a silicon septum under nitrogen atmosphere, it was pre-equilibrated for 15 min at 50 °C in a thermostatic bath. Afterwards, the stainless steel needle of the SPME device where the fibre is

housed was pushed through the vial septum. Then, the fibre was pushed out of the housing and exposed for 2 hours at 50 °C to the vial headspace. After extraction, the fibre was pulled into the needle assembly, the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC for thermal desorption of the analytes at 270 °C for 1 min.

## 2.5. Gas chromatography analysis

### 2.5.1. GC-FID and GCO

The analyses were performed with a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and an olfactory detector. The fused silica capillary column employed to carry out the chromatographic separations was a Chrompack (Varian, Middelburg, The Netherlands) CP-WAX 57CB (50 m x 0.25 mm i.d., 0.2 µm film thickness) with helium as a carrier gas at a constant flow-rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature was programmed as follows: 40 °C (2 min), 5 °C min<sup>-1</sup> to 220 °C (22 min). The fused silica capillary column used to verify the identity of the compounds was a HP-5 (Agilent Technologies, USA) (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) with helium as a carrier gas at a constant flow-rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature program was: 40 °C (5 min), 3.5 °C min<sup>-1</sup> to 120 °C, 10 °C min<sup>-1</sup> to 210 °C (10 min). In both cases, the split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270 °C for 1 min and the temperature of the FID was set at 250 °C.

To split the effluent into the FID and the sniffing port, the end of the capillary column was connected to a splitting assembly based on the Capillary Flow Technology (Agilent Technologies, USA). The split ratio for the olfactometric analysis was 1:1 (FID:sniffing port) and it was achieved by using two deactivated and uncoated fused silica capillaries of the same length and width as a transfer line between the splitting assembly and the detectors. Moreover, the use of an olfactory detector control module commercialized by SGE International (Ringwood, Australia) that incorporates a heated transfer section from the GC oven to the glass detection cone, kept the unit at a suitable temperature to transfer the volatile compounds to the detection cone without losses due to condensation. Furthermore, the glass cone is purged with humidified air to prevent nasal mucous membranes from drying out in order to maintain olfactory sensitivity.

Timing and odour descriptions were recorded by two trained sniffers after each sample injection and they were replaced at 15 min intervals to avoid fatigue and distractions. Each sample was analysed in triplicate by each trained researcher.

### **2.5.2. GC-MS**

GC-MS analyses were performed with a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph coupled to an HP-5973 mass selective detector. Separation was achieved under the same operating conditions described above and using the same columns as in the GC-FID and GCO analyses. The mass spectrometer operated in the electron impact ionization mode (70 eV). Interface, source and quadrupole temperatures were 200 °C, 230 °C and 150 °C, respectively, and the mass range was from 35 to 300 amu. The split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270 °C for 1 min.

### **2.6. Aroma Extract Dilution Analysis**

To get a hierarchically classification of the most odour-active compounds in roasted pistachios we determined the flavour dilution (FD) factors (obtained by two trained sniffers in triplicate) by AEDA, which was carried out in two different ways depending on the extraction technique employed. When dealing with the DSE, the aroma extract obtained was stepwise diluted (1:4) with dichloromethane [33]. But when the sampling was performed with HS-SPME, a new approach to the AEDA was used as no physical extract was obtained. It consists of stepwise reduction of the amount of roasted pistachio that was put into the vial (1:4) before carrying out the SPME by adding a suitable amount of Milli-Q water to keep constant the headspace/sample ratio. In both cases, the dilutions were carried out until no odorant was detected by sniffing the highest dilution. Two experienced sniffers performed the AEDA experiments and their response (sensitivity) to the individual compounds did not differ by more than 2 FD-factors.

### **2.7. Compounds identification**

The odorants detected in the olfactometric study were identified by comparison with reference compounds on the basis of the following criteria: odour quality perceived at the sniffing port, mass spectra obtained and retention indices (RI) on the two stationary phases of different polarity employed (CP-WAX 57CB and HP-5). Retention indices were calculated from the retention times of a series of *n*-alkanes (from 6 to 26 carbon atoms) injected under the same chromatographic conditions.

## 2.8. Sensory analysis

To determine the similarity between the aroma of the different extracts obtained with the two extraction techniques and the aroma of the fresh roasted pistachios, a panel of 8 trained assessors evaluated the global odour for each particular case. Firstly, panellists were familiarized with the roasted pistachio aroma and were then asked to agree in a common list of 6 descriptors: green, sweet, roasted, chocolate/coffee, rancid and nutty (this last was evaluated as a global impression).

Then, assessors were asked to rate the intensity on a discontinuous scale from 0 (no similarity) to 5 (equal) for the 6 descriptors above specified. The coefficients of variance found for each single panellist for different replicates of one sample were <10%.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Optimization of DSE parameters

Taking into account that the aim of this study was to extract the odorant compounds of the pistachio samples, when optimizing the parameters that affected the extraction equilibrium we evaluated not only the chromatographic areas of the compounds extracted (FID response), but also the number and intensity of the odorants perceived (GCO response). All the experiments were performed in triplicate.

Among the different solvents usually used to extract food odorants we tested diethyl ether, hexane and dichloromethane. The results showed that the best efficiency was obtained when using dichloromethane because hexane resulted in volatiles losses due to its high boiling point and diethyl ether gave a poorer chromatographic response (nearly 9% smaller than the one obtained when using dichloromethane). Once the solvent was chosen, it was necessary to determine the volume required to get the maximum extraction efficiency. Nevertheless, this parameter is closely related to the sample amount used so, the sample weight/solvent volume ratio was optimized. With this aim, different ratios (from 1:1 to 1:4) were tested by varying both parameters: sample weight ranged from 50 to 200 g and solvent volume ranged from 50 to 200 mL. The best results, both chromatographic and olfactometric, were obtained for the 1:1 ratio. To make easier the sample handling, mainly during the filtration process, we choose as the optimal values 100 g of finely ground roasted pistachios extracted with 100 mL of dichloromethane.

Regarding to extraction time and temperature, both parameters were studied simultaneously as they are strongly influenced one by the other [34]. To determine the optimum sampling conditions,

different experiments were carried out for 2.5, 5 and 7.5 hours, at 0 °C and 25 °C. Higher temperatures were not evaluated since it could imply losses of some aromatic compounds. The results showed that, whatever the extraction time, the efficiency decreased at lower temperature. With regard to sampling time, the shortest one resulted in a poorer chromatographic profile, while the largest one did not improve significantly (less than 5%) the extraction yield compared to that of 5 hours.

Therefore, the optimum DSE results were obtained when 100 g of finely ground roasted pistachios were extracted for 5 hours at 25 °C with 100 mL of dichloromethane.

### 3.2. Optimization of HS-SPME parameters

Although the reproducibility of fibres has considerably been improved during the last years, we used more than one in order to take into account the variability response among them.

To select the best conditions, we evaluated both chromatographic areas and number and intensity of odorants extracted, in triplicate, as was done in the previous section.

The choice of the SPME fibre coating was the first parameter considered. The coatings checked are listed in section 2.3. The results showed that, whereas with PDMS, PDA or CAR-PDMS the number of odorant regions was between 40 and 45 for the first two fibres and between 60 and 65 for the third one, when using DVB/CAR/PDMS up to 75 odorants were detected. Thus, this last fibre was selected as the optimum for the extraction.

Another important issue that had to be considered was whether adding a solvent to ground pistachios (solid sample) could improve the SPME extraction. Although different solvents and mixtures were tested, the results showed that the use of organic solvents implied a competence in the extraction process, so we decided to work only with Milli-Q water to homogenize the sample and accelerate the extraction [35].

The sample/headspace ratio was the next parameter studied, because it is well known that the headspace volume affects the extraction efficiency [36]. Thus, we added different water volumes to pistachio samples to reach 5 and 10 mL in 20 mL vials, and 25 mL in 50 mL vials. The best response was obtained when the experiments were carried out with 25 mL of the sample+water mixture in a 50 mL vial.

Related to ionic strength it is known that the higher the ionic strength, the lower the solubility of neutral molecules in the water and the less likely these molecules are to pass from the solid matrix

to the water. As a result, the extraction efficiency of these molecules decreases [35]. We checked whether the addition of salt had any influence on the extraction of the odour-active compounds and the results corroborated this negative effect for most of the compounds of interest. Consequently we decided to avoid the salt addition to the samples.

Extraction time and temperature were again simultaneously studied, so different experiments were performed in the range from 2 to 4 h (shorter times did not ensure the suitable aromatic perception of all the compounds) and from 30 to 50 °C. The results showed that the poorest chromatographic and olfactometric responses were obtained when working at the lowest temperature and the shortest sampling time (2 h, 30 °C). However, as the microextraction is an exothermic process, the highest temperatures and the largest times (4 h, 50 °C) did not improved the overall extraction efficiency. Therefore, taking into account that the chromatographic and olfactometric profiles obtained at 2 h, 50 °C were not significantly different (<5%) to the ones obtained at 3 h, 40 °C, we decided to employ the shortest extraction time (2 h, 50 °C) to make faster the sample preparation.

Hence, the optimal conditions for HS-SPME were achieved by mixing 15 g of finely ground pistachios with 15 mL of Milli-Q water (these amounts of sample+water imply a volume of 25 mL) into a 50 mL vial with a little magnetic stir bar and extracting for 2 hours at 50 °C.

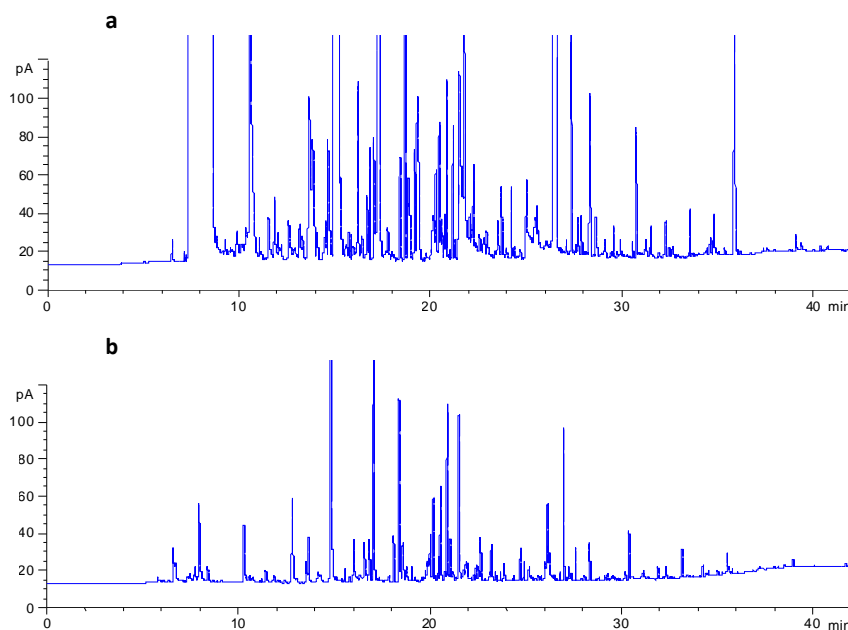
### 3.3. Precision of the developed methods

Once the optimum conditions were determined, we evaluated the precision of both methods in terms of within-day repeatability and between-days repeatability (intermediate precision) of the chromatographic areas. Since the chromatogram profiles obtained were very rich but very different depending on the extraction technique employed (**Figure 1**), to suitably evaluate these performance parameters, we selected 13 chromatographic peaks which were positively identified by both techniques according to the following criteria: they should present different retention times along the entire chromatogram; they should cover the range of widths and heights of the whole of the chromatographic peaks; they should correspond to aromatic compounds with different contribution to the aroma (i.e. different FD); and they should belong to different chemical families.

Both precision parameters were expressed by means of the percentage of relative standard deviation (%RSD). The repeatability was calculated by injecting, consecutively, 5 different extracts obtained the same day while the intermediate precision was calculated from the results acquired when injecting 6 different extracts obtained over a month (approximately one extract every week).

**Table 1** shows the results obtained for the compounds selected. The low %RSD values for both

parameters and both techniques allowed us to confirm that the accuracy of the optimized methods was very good. However, for almost all the chromatographic peaks, the RSD values (both for repeatability and intermediate precision) obtained when working with HS-SPME were smaller than the ones obtained when working with DSE-HVT. Therefore, although in some cases the %RSD values obtained with each one of the techniques were not statistically different, the fact that the SPME technique always presented lower RSD values allows us to conclude that the SPME technique provided better accuracy.



**Figure 1.** Chromatograms belonging to the extract of roasted pistachio obtained in the GC-FID (a) with DSE-HVT technique and (b) with HS-SPME technique. The chromatograms were achieved by using a CP-WAX 57CB column and without splitting to the sniffing port.

### 3.4. DSE-HVT versus HS-SPME

As shown in **Figure 1**, the GC-FID chromatogram belonging to the extract obtained by application of DSE-HVT presents more and higher peaks than the one obtained by application of HS-SPME. This greater response is due to the fact that, whereas the headspace technique only allows the extraction of those actually volatile compounds, when using DSE, any compound that exhibits affinity to the solvent employed will be extracted.

However, when the extracts obtained with both techniques were analysed by gas chromatography-olfactometry, the results were very similar: 75 and 74 different odour-active regions were detected for the DSE-HVT and the HS-SPME techniques, respectively. Moreover, most of these regions coincided in both cases in their retention times and the descriptors employed to define the odours perceived. In that way, as usually in this kind of flavour studies [5, 6, 27], when using a polar column, fruity and chemical notes were perceived at lower retention indices, followed by green and earthy notes. At the end of the analysis, lactic and fatty odours, followed by burned and caramelized ones were detected. Therefore, this comparison shows that, although DSE-HVT technique allows the extraction of a higher number of compounds, when we focus only on the extraction of odour-active compounds, these are almost the same ones regardless of the extraction technique employed. The difference lies in the perception intensity of some of these compounds (i.e. different flavour dilution (FD) factors).

Retention time (min)	Compound	DSE-HVT			HS-SPME		
		Mean of area	%RSD <sub>rep.</sub>	%RSD <sub>int.pr.</sub>	Mean of area	%RSD <sub>rep.</sub>	%RSD <sub>int.pr.</sub>
7.8	Isobutanal	69382	2.4	4.6	793788	2.4	5.0
9.5	Diacetyl	672958	2.0	5.2	44691	2.2	4.3
11	2,3-pentanedione	699943	4.9	8.9	126680	3.4	4.7
11.9	Hexanal	3278534	6.5	8.6	563835	3.1	4.1
13.2	(E)-2-pentenal	452619	4.7	6.1	75525	2.1	4.6
15.3	2 / 3-methyl-1-butanol*	6190691	5.1	9.6	469958	3.9	6.2
18.9	2-ethylpyrazine	1827142	6.9	10.5	934466	2.6	4.8
19.9	Dimethyltrisulfide	44293	5.9	9.8	11267	3.3	6.7
20.3	2-ethyl-5-methylpyrazine	5587016	6.3	7.4	2647486	3.0	5.3
23	2-acetylfuran	383012	5.1	8.3	177382	2.5	6.1
31.1	Guaiacol	89875	4.8	7.7	34539	3.2	4.9
32.3	2-phenylethanol	1808021	5.2	9.5	876731	2.8	4.6
35.4	Furaneol	174012	6.1	10.3	529962	3.2	6.4

%RSD<sub>rep.</sub>: relative standard deviation of the repeatability

%RSD<sub>int.pr.</sub>: relative standard deviation of the intermediate precision

\* Compound with FD 16, so it does not appear in Table 2

**Table 1.** Values of repeatability and intermediate precision for the selected compounds expressed by means of the percentage of relative standard deviation (% RSD).

By applying the suitable AEDA for each extraction technique, the most odour-active regions were determined: these are the ones with higher FD factors (ranging from 64 to 1024 for at least one of the two extraction techniques). The results are summarized in **Table 2**, where the different odours perceived have been arranged following their retention indices in the polar column. It should be



noted that, although each aroma perceived is mostly due to a single compound, among the different odour-active regions detected in both extracts, we found 3 odours that were originated by a mixture of some compounds. This is the case of the flavour-active regions number **15** (roasted nut, corn), **21** (cooked potato) and **24** (fatty, green-like), that have been positively identified as a mixture of 2,3-dimethylpyrazine, 2,6-dimethylpyrazine and 2-ethylpyrazine (region **15**), a mixture of 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5(or 6)-dimethylpyrazine and methional (region **21**), and a mixture of 2-acetylfuran, 3,5-diethyl-2-methylpyrazine and 2,3-diethyl-5-methylpyrazine (region **24**).

As shown in **Table 2**, 34 and 45 flavour-active regions with a  $FD \geq 64$  were detected when using DSE-HVT and HS-SPME, respectively. As it can be seen, not always a high FD value obtained when working with an extraction technique implies a high FD value when working with the other one. In fact, only 15 of these regions were perceived with the same FD in both extracts, being 1024 the highest FD factor, which was found for the odorant regions number **2**, **13**, **15**, **19**, **22** and **42**. After these mainly toasted, heavy and rubbery notes, and in descending order of FD, we found other odorant regions with a coincident FD in both extracts: 6 regions with a FD of 256 that mainly provided fruity, earthy and green notes (regions **5**, **11**, **14**, **18**, **25** and **29**) and 3 with a FD of 64 that contribute to the aroma extracts with buttery, fruity and flowery notes (regions **7**, **10** and **38**).

However, there are also some differences between the results obtained from the distillate and the ones from the SPME that give evidence of the different extraction and concentration effectiveness of both techniques. On one hand, 5 odour-active regions were detected on the SPME extract but not on the distillate: **20** (mushroom), **23** (anise-like, fennel), **26** (roasted nuts, popcorn), **28** (vomit, lactic) and **44** (stall, animal), which correspond to two unknown odorants (regions **20** and **23**) plus 2-acetylpyridine (region **26**), butyric acid (region **28**) and 4-ethylphenol (region **44**). On the other hand, while 19 flavour-active regions were perceived in the SPME with a higher FD factor than in the distillate, only 6 odours appeared in the distillate with a higher FD factor: **1** (malty, solvent-like), **3** (fruity, strawberry), **17** (sulphur-like), **21** (cooked potato), **31** (blue cheese, sweaty) and **32** (deep-fried), which have been positively identified as isobutanal (region **1**), ethyl propanoate (region **3**), dimethyltrisulfide (region **17**), a mixture of 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5(or 6)-dimethylpyrazine and methional (region **21**), 2 and 3-methylbutyric acid (region **31**) and (E,E)-2,4-decadienal (region **32**).

From all these results it seems that, although DSE could extract compounds with higher molecular weight and lower volatility than the HS-SPME [37] it is less sensitive to some trace components, which are very important in the flavour perception of foodstuffs. Nevertheless, working with the distillate has some advantages because a liquid extract is obtained so, unlike when working with the

SPME, the same sample can be tested many times and it can be concentrated to different degrees to achieve more chromatographic or olfactometric response. On the other hand, the SPME technique shows several advantages: simplicity, rapidity and cleanliness, as it is solvent-free and involves very little sample manipulation.

However, the aroma representativeness of the sample extract is the crucial parameter to decide which extraction technique is the most appropriate. So, to determine the similarity between the aroma of the different extracts obtained and the aroma of the fresh roasted pistachios, a panel of 8 trained assessors evaluated the global odour for each particular case by using the selected descriptors: green, sweet, roasted, chocolate/coffee, rancid and nutty. For the DSE-HVT extract, similarity tests were performed by placing a drop of it on a perfume sampling paper and comparing the aroma perceived with the original roasted pistachio odour as a pair.

To check the aroma similarity between the SPME extracts and the roasted pistachio nuts we used the direct gas chromatography-olfactometry technique (D-GCO) [38]. Since a short deactivated capillary column is used, this technique avoids chromatographic separation of flavour volatiles, so the analyst perceives the extract as a global odour. In this case, the aroma detected is also compared with the original roasted pistachio one as a pair.

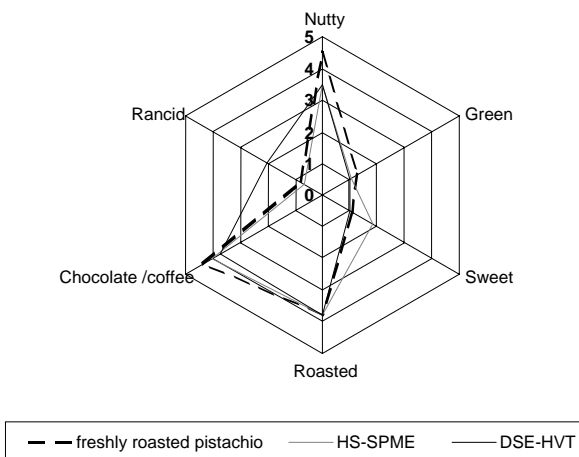


Figure 2. Odour profiles of freshly roasted pistachio and its aromatic extracts obtained by DSE-HVT and HS-SPME.

The results are shown in Figure 2. As it can be seen, both extracts gave similar intensity values of roasted, green and coffee to the natural roasted pistachio. However, when dealing with DSE-HVT, the descriptor “rancid” was perceived with a higher intensity. This behaviour can be due to the fact

that, although the panellists spent some seconds before sniffing the drop of extract placed on the perfume sampling paper to eliminate the solvent by evaporation, this solvent note persisted. Regarding to the HS-SPME technique, all the panellists agreed with the good correlation between the extract aroma and the real sample except on the perception of an intense plastic note on the SPME extract (in **Figure 2** this descriptor does not appear because this is not a descriptor of pistachio aroma). This fact was because of the high affinity of the fibres used for the sulphur compounds which give this kind of aromas [39]. These low differences observed in the spider-web diagram between the real pistachio samples and both kind of extracts were corroborated when the panellists were asked about the degree of similitude of the extracts to the real sample: the values obtained were 75-80% of likeness in both cases.

#### 4. CONCLUSIONS

In conclusion, although the DSE followed by HVT has proved to be a good technique to analyse pistachio aroma as well as other food aroma, the results show that the HS-SPME is a good alternative to obtain representative pistachio aroma extracts with a wide range of odorants, suitable for GCO, and that requires shorter time for sampling. Although both extraction techniques provide accurate information about the volatile fraction that will be perceived by the consumer, HS-SPME has demonstrated to be able to extract more odour-active regions that can be detected until higher flavour dilution factors. Moreover, and thanks to the approach to the AEDA employed, it has been possible to establish an initial hierarchy on the contribution of each compound to roasted pistachio aroma and the reconstitution studies would be the next step.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (project AGL2007-61550) and also by the Ingenio 2010 program from the Spanish Ministry of Industry in a CENIT project called MET-DEV-FUN and by the leader company of the project consortium, La Morella Nuts S.A. (Reus, Catalonia, Spain).

**Table 2.** Main odorants found in roasted pistachio nuts with FD  $\geq$  64 at least in one of the two extraction techniques.

Odour-active regions	RI on				FD factor				Identification			
	RT (min)	CP-WAX	HP-5	odour description	DSE-HVT	HS-SPME	compound	CAS no.	MSD			
									DSE-HVT	HS-SPME	RI	odour
1	7.8	<i>a</i>	<i>a</i>	Malty, solvent-like	1024	256	isobutanal	78-84-2	X	X	X	X
2	8.6	936	<i>a</i>	Malty, bitter almonds	1024	1024	2 / 3-methylbutanal	96-17-3	X	X	X	X
3	9.4	958	nd	Fruity, strawberry	1024	1024	Ethyl propanoate	590-86-3	X	X	X	X
4	9.5	968	<i>b</i>	Butter	256	64	Diacetyl	105-37-3	X	X	X	X
5	10.2	1005	773	Strawberry	256	256	2-methylpropyl acetate	431-03-8	X	X	X	X
6	10.9	1031	801	Fruity	64	256	Ethylbutyrate	110-19-0	X	X	X	X
7	11	1041	702	Butter	64	64	2,3-pentanedione	105-54-4	X	X	X	X
8	11.2	1044	843	Fruity, apple	256	1024	Ethyl-2-methylbutyrate	600-14-6	X	X	X	X
9	11.9	1071	794	Green, grass	64	1024	Hexanal	7452-79-1	X	X	X	X
10	13.2	1122	753	Fruity	64	64	(E)-2-pentenal	66-25-1	X	X	X	X
11	16	1226	896	Fishy	256	256	(Z)-4-heptenal	1576-87-0	X	X	X	X
12	16.3	1233		Earthy	16	1024	<i>unknown</i>	6728-31-0	X	X	X	X
13	17.4	1275	1001	Citrus, fresh	1024	1024	Octanal	124-13-0	X	X	X	X
14	17.7	1284	975	Mushroom	256	256	1-octen-3-one	4312-99-6	X	X	X	X
15	18.9	1327	nd	Roasted nuts, corn	1024	1024	2,3-dimethylpyrazine	5910-89-4	X	X	X	X
16	19.5	1350	923	Geranium	1024	1024	2,6-dimethylpyrazine	108-50-9	X	X	X	X
17	19.9	1366	965	Sulphur-like	1024	256	2-ethylpyrazine	13925-00-3	X	X	X	X
18	20.3	1381	997	Fruity, strawberry	4	256	<i>unknown</i>	3658-80-8	X	X	X	X
19	21	1410		Rubber, plastic	1024	256	Dimethyltrisulfide	13360-64-0	X	X	X	X
20	21.2	1429	nd	Mushroom	1024	1024	2-ethyl-5-methylpyrazine	3391-86-4	X	X	X	X

<b>21</b>	21.7	1439	1077	1024	256	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	13360-65-1	X	X	X	c
			1085	1024	256	2-ethyl-3,5(or 6)-dimethylpyrazine	55031-15-7	X	X	X	X
<b>22</b>	22.5	1467	907	1024	256	Methional	3268-49-3			X	X
<b>23</b>	22.7	1469		1024	1024	<i>unknown</i>					
			nd	nd	1024	<i>unknown</i>					
<b>24</b>	23	1487	1170	64	256	2-acetylfuran	1192-62-7	X	X	X	X
<b>25</b>	23.7	1521	1150	64	256	3,5-diethyl-2-methylpyrazine	18138-05-1	X	X	X	c
<b>26</b>	24.4	1573	1160	256	256	2,3-diethyl-5-methylpyrazine	18138-04-0	X	X	X	X
<b>27</b>	25.1	1584	1026	16	1024	(E)-2-nonenal	18829-56-6	X	X	X	X
<b>28</b>	25.5	1604	nd	nd	1024	2-acetylpyridine	1122-62-9		X	X	X
<b>29</b>	26	1621	1043	256	256	<i>unknown</i>					
<b>30</b>	26.5	1649	879	16	1024	Butyric acid	107-92-6			X	X
			1324	1024	256	<i>unknown</i>					
<b>31</b>	26.8	1659	1098	1024	256	Phenylethanal	122-78-1		X	X	X
<b>32</b>	27.7	1694	1383	256	64	2 / 3-methylbutyric acid	116-53-0			X	X
<b>33</b>	29.1	1761	1093	1024	256	(E,E)-2,4-decadienal	503-74-2			X	X
<b>34</b>	30	1805	1039	64	1024	2-acetyl-2-thiazoline	25152-84-5			X	X
<b>35</b>	30.4	1824	1119	64	256	Methyl laurate	29926-41-8			X	X
<b>36</b>	31.1	1861	1387	256	1024	$\beta$ -damascenone	111-82-0			X	X
<b>37</b>	31.4	1872	1284	256	1024	Guaiacol	23726-93-4			X	X
<b>38</b>	32.3	1916	nd	64	64	Phenylmethanol	90-05-1	X	X	X	X
<b>39</b>	33.5	1981	1024	4	1024	2-phenylethanol	100-51-6	X	X	X	X
<b>40</b>	33.9	2006	1387	64	256	<i>unknown</i>	60-12-8	X	X	X	X
<b>41</b>	35.1	2063	1284	64	1024	trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal	134454-31-2			X	X
<b>42</b>	35.4	2080	nd	1024	1024	Octanoic acid	124-07-2			X	X
			nd	1024	1024	Furaneol	3658-77-3	X	X	X	X



## REFERENCES

- [1] A.H. Ensminger, M.E. Ensminger, J.E. Konlande, J.R.K. Robson, *Foods & Nutrition Encyclopedia*, CRC Press, Boca Raton, 1994, pp. 1619.
- [2] M. Venkatachalam, S.K. Sathe, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4705.
- [3] C. Alasalvar, F. Shahidi, K.R. Cadwallader, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 5067.
- [4] G.L. Baker, J.A. Cornell, D.W. Gorbet, S.F. O'Keefe, C.A. Sims, S.T. Talcott, *J. Food Sci.* 68 (2003) 394.
- [5] I. Chetschik, M. Granvogl, P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10237.
- [6] A. Burdack-Freitag, P. Schieberle, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 6351.
- [7] P.M. Kris-Etherton, G. Zhao, A.E. Binkoski, S.M. Coval, T.D. Etherton, *Nutr. Rev.* 59 (2001) 103.
- [8] E. Ros, J. Mataix, *Br. J. Nutr.* 96 (2006) S29.
- [9] M. Kornsteiner, K.-H. Wagner, I. Elmadfa, *Food Chem.* 98 (2006) 381.
- [10] E. Küçüköner, B. Yurt, *Eur. Food Res. Technol.* 217 (2003) 308.
- [11] J. Birch, K. Yap, P. Silcock, *Int. J. Food Sci. Technol.* 45 (2010) 81.
- [12] A.İ. Köksal, N. Artik, A. Şimşek, N. Güneş, *Food Chem.* 99 (2006) 509.
- [13] J.S. Elmore, I. Nisyrios, D.S. Mottram, *Flavour Fragr. J.* 20 (2005) 501.
- [14] C. Alasalvar, A.Z. Odabasi, N. Demir, M.Ö. Balaban, F. Shahidi, K.R. Cadwallader, *J. Food Sci.* 69 (2004) 99.
- [15] S. Krist, H. Unterweger, F. Bandion, *Eur. Food Res. Technol.* 219 (2004) 470.
- [16] H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, Springer, Berlin, 2004, pp. 342.
- [17] A. Holley, in: A. Voilley, P. Etiévant (Eds.), *Flavour in Food*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2006, pp. 36.
- [18] B.A. Zellner, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 123.
- [19] A.R. Mayol, T.E. Acree, in: J.V. Leland, P. Schieberle, A. Buettner, T.E. Acree (Eds.), *Gas Chromatography-Olfactometry. The State of the Art*, ACS Symposium Series, Washington D.C., 2001, pp. 1.
- [20] F. Ullrich, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 184 (1987) 277.
- [21] P. Schieberle, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 185 (1987) 111.
- [22] S.M. van Ruth, *Biomol. Eng.* 17 (2001) 121.
- [23] T.H. Parliament, in: R. Marsilli (Ed.), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, pp. 1.
- [24] T.P. Wampler, in: R. Marsilli (Ed.), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, pp. 27.

- [25] A.D. Harmon, in: R. Marsilli (Ed.), *Techniques for Analyzing Food Aroma*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, pp. 81.
- [26] W. Grosch, in: L.M.L. Nollet (Ed), *Handbook of Food Analysis. Physical Characterization and Nutrient Analysis*, Marcel Dekker, Inc., New York, 2004, pp. 717.
- [27] M.P. Martí, M. Mestres, C. Sala, O. Busto, J. Guasch, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7861.
- [28] V. Ferreira, R. López, A. Escudero, J.F. Cacho, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 349.
- [29] C. Priser, P.X. Etiévant, S. Nicklaus, O. Brun, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3511.
- [30] F. San-Juan, J. Pet'ka, J. Cacho, V. Ferreira, A. Escudero, *Food Chem.* 123 (2010) 188.
- [31] A. Sen, G. Laskawy, P. Schieberle, W. Grosch, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 757.
- [32] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [33] P. Schieberle, in: A.G. Goankar (Ed.), *Characterization of Food: Emerging Methods*, Elsevier Science, Amsterdam, 1995; pp. 403.
- [34] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [35] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 240.
- [36] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, Inc., New York, 1997.
- [37] J. Cai, B. Liu, Q. Su, *J. Chromatogr. A* 930 (2001) 1.
- [38] B. Rega, N. Fournier, E. Guichard, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7092.
- [39] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 211.



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

*Determination of roasted pistachios (Pistacia vera L.) key odorants  
by headspace solid-phase microextraction and  
gas chromatography-olfactometry*

**Journal of Agricultural and Food Chemistry (2011)**

**DOI: 10.1021/jf104496u**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## **Determination of Roasted Pistachios (*Pistachia vera* L.) Key Odorants by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Olfactometry**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres

Research Group of Analytical Chemistry of Wine and Food

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry

Campus Sescelades. Facultat d'Enologia de Tarragona

Universitat Rovira i Virgili. 43007 Tarragona (Spain)

### **ABSTRACT**

Key odorants in roasted pistachio nuts have been determined for the first time. Two different pistachio varieties (Fandooghi and Kerman) have been analyzed by means of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-olfactometry (GCO). The aroma extract dilution analyses (AEDA) applied have revealed 46 and 41 odor-active regions with a flavor dilution (FD) factor  $\geq 64$  for the Fandooghi and the Kerman varieties, respectively, and 39 of them were related to precisely identified compounds. These included esters, pyrazines, aldehydes, acids, furans and phenols. The results show that the Fandooghi variety presents, not only more odor-active regions, but also higher FD factors than the Kerman variety, that can lead to the conclusion that the first variety has a richer aromatic profile than the second one. The descriptive sensory analysis (DSA) showed that the roasted, chocolate/coffee and nutty attributes were rated significantly higher in Fandooghi variety, whereas the green attribute was significantly higher in the Kerman one.

**KEYWORDS:** Pistachio aroma; key odorants; GCO; HS-SPME; Fandooghi variety; Kerman variety

## 1. INTRODUCTION

Among all the edible nuts, peanuts, almonds, hazelnuts, pecans, pine nuts, macadamias, pistachios and walnuts are the most popular and commercially valuable. They have been an important source of nutrients (1, 2) since ancient times and it has been proved that they play a relevant role on human diet and moreover, that they are of great benefit to consumers' health (3, 4). Nowadays, a minor part of the nut crop is consumed natural or raw, while the majority is roasted and finally used as a snack or as an ingredient in the food industry. Several studies have been published on their chemical (1, 2, 5-7) and, for most of them, volatile composition (8-10) for both raw and roasted nuts, although it must be said that raw nuts have a rather bland aroma. Their characteristic nut odor is mainly due to some compounds generated during the roasting process (11-14).

Pistachio (*Pistacia vera* L.) is a member of the *Anacardiaceae* family, the only pistachio species that provides edible nuts. It is native of arid zones of Central and West Asia, where it is distributed as well as throughout the Mediterranean basin (15), and the Islamic Republic of Iran is the major supplier in the world with an annual production of 230000 t in 2007, followed by Turkey and the United States of America (<http://www.fao.org/corp/statistics/en>).

Some studies have been published on the pistachio chemical composition (6, 16) and its antifungal (17), antimicrobial (18) and antioxidant (19) activities; moreover, different studies have been carried out to determine its geographical origin and the variety effects (20-22). Nevertheless, only two previous studies have been published about its volatile composition (23, 24), although only the latest study considered the contribution of these compounds to the aroma. This kind of studies are very important because, as in any other food product, pistachio quality is closely related to the aroma detected by consumers and this attribute will have a great influence on its acceptance or rejection.

The characteristic and unique aroma of every food commodity is attributed to a complex mixture of hundreds of different and very heterogeneous chemicals (alcohols, aldehydes, esters, ketones, pyrazines, acids, terpenes, etc.), present at variable concentrations (ranging from several mg kg<sup>-1</sup> to a few ng kg<sup>-1</sup>) and each one of them with its own chemical properties and a different contribution to the whole aroma (25). Indeed, it is well known that, although the odorants must be volatile to reach the nose and interact with the appropriate receptors located on the olfactory epithelium (26), only a limited number of volatiles have an actual contribution to the overall aroma.

For assessing the odor-active compounds in complex mixtures such as foods, gas chromatography olfactometry (GCO) is the most appropriate analytical tool as it allows perceiving the eluted analytes

by a conventional detector (FID, MSD) and the human nose, simultaneously. As a result, GCO provides both instrumental and sensory results (27, 28).

Different techniques have been developed to collect and process the GCO data obtained in order to evaluate the contribution of each odorant to the sample aroma. Among them, the aroma extract dilution analysis (AEDA) is one of the most used (29, 30). AEDA involves stepwise dilution of the aroma extract followed by an evaluation of each dilution by GCO until no odors are perceived in the GCO effluent, so the last dilution step where an odorant is perceived is its flavor dilution (FD) factor, which can be considered a good indicator of the odor potency of that compound. This makes AEDA a very suitable and valuable screening tool for ranking odor-active compounds in a sample according to their relative odor potency.

However, and prior to the GCO analysis, a representative aromatic extract has to be obtained to get a reliable aroma characterization. Indeed, the food flavor profile obtained will strongly depend on the isolation procedure performed. Among all the sampling techniques, the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) has proved to be a quick, solvent-free and a quite simple technique that requires very little sample manipulation (31), also when applied on the analysis of food aroma compounds (32).

Therefore, the aim of this study is to characterize the roasted pistachio nut aroma by GCO and employing the HS-SPME technique which, in a previous study performed in our laboratory (24), has already demonstrated to be suitable for providing representative pistachio aroma extracts. By application of the AEDA, the most potent odorants present in two of the most popular pistachio varieties (Fandooghi and Kerman) have been analyzed and compared.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Samples

Representative samples of the "Fandooghi" (Iran) and "Kerman" (Spain) varieties were supplied from an important nut processing company whose quality control ensure the accomplishment of the specifications of each one of the varieties processed and also that the samples have been collected and transported under the optimal conditions. Moreover, to take into account the sample variability, different batches of pistachios were sampled and these different aliquots were mixed in order to get a single sample as representative as possible.

To get similar products than those obtained in an industrial roasting treatment, for both varieties, portions of 1 kg of shell-free samples were roasted for 20 min at 160 °C in a laboratory electrical oven. After being roasted, the pistachio samples were vacuum-packed in 100 g portions into non permeable polypropylene/aluminum/ polyethylene bags and stored at room temperature until used for analysis.

## 2.2. Reagents and chemicals

The chemical standards of the aroma compounds were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and Lancaster (Bischheim, France) and their purity was above 90% in all cases. Pure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The oil used to determine the odor thresholds was a deodorized and distillate vacuum pump oil for research applications.

## 2.3. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

The SPME holder for manual sampling and the StableFlex Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fibers with a 50/30 µm film thickness used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The fibers were conditioned before use and thermally cleaned between analyses by inserting them into the GC injector port at 270 °C.

The volatile compounds were extracted according to the optimum conditions determined in a previous study (24), where the different parameters that influence the HS-SPME were carefully studied by assessing both the chromatographic areas and the number and intensity of the odorants extracted. Thus, 15 g of fresh roasted pistachios finely ground in a coffee mill and passed through a sieve (1.5 mm of diameter) with 15 mL of Milli-Q water (to homogenize the sample and accelerate the extraction (24, 33)) and a magnetic stir bar (as the extraction was carried out under constant magnetic stirring) were placed into a 50 mL glass vial, being the sample/headspace ratio 1:1. Then, the vial was tightly capped with a silicon septum under nitrogen atmosphere and it was pre-equilibrated for 15 min at 50 °C in a thermostatic bath. Afterwards, the SPME device was manually pushed through the vial septum and the fiber was exposed for 2 hours (shorter times did not ensure the suitable aromatic perception of all the compounds) at 50 °C (higher temperatures during such long time could promote changes in sample composition) to the headspace vial. After extraction, the fiber was pulled into the needle assembly and the SPME device was removed from the vial. It was finally inserted into the injection port of the GC for thermal desorption of the analytes at 270 °C for 1 min in the splitless mode.

The precision of the method was assessed in terms of within-day repeatability and between-days repeatability (intermediate precision). These parameters were evaluated not only from the chromatographic response, but also from the number, intensity and quality of the odorants perceived. Both parameters were expressed by means of the percentage of relative standard deviation (%RSD). The first one was calculated by injecting, consecutively, 5 different extracts obtained the same day while the second one was calculated from the results acquired when injecting 6 different extracts obtained over a month (approximately one extract every week). The results obtained were  $RSD < 4\%$  for repeatability and  $RSD < 7\%$  for intermediate precision. These low %RSD values allowed us to confirm that the precision of the optimized HS-SPME technique was very good.

## 2.4. Gas chromatographic analysis

### 2.4.1. GC-FID and GCO

The analyses were made on a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and an olfactory detector. Chromatographic separations were performed by a Chrompack (Varian, Middelburg, The Netherlands) CP-WAX 57CB (50 m x 0.25 mm i.d., 0.2  $\mu\text{m}$  film thickness) fused silica capillary column and the oven temperature program was: 40  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), 5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 220  $^{\circ}\text{C}$  (22 min). To verify the identity of the compounds, a HP-5 (Agilent Technologies, USA) (30 m x 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) fused silica capillary column was employed with the following oven temperatures: 40  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), 3.5  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 120  $^{\circ}\text{C}$ , 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 210  $^{\circ}\text{C}$  (10 min). In both cases, the carrier gas was helium at a constant flow-rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ , the split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min and the temperature of the FID was set at 250  $^{\circ}\text{C}$ .

The GCO analyses were carried out using a splitting assembly based on the Capillary Flow Technology (Agilent Technologies, USA), where the end of the capillary column is connected, which enables the effluent to be split into the FID and the sniffing port. The split ratio for the olfactometric analysis was 1:1 (FID:sniffing port) and it was achieved by employing two deactivated and uncoated fused silica capillaries of the same length and width as a transfer line between the splitting assembly and the detectors. In addition, an olfactory detector control module commercialized by SGE International (Ringwood, Australia), that incorporates a heated transfer section from the GC oven to the glass detection cone, keeps the unit at a suitable temperature to transfer the volatile compounds to the detection cone without losses due to condensation. Furthermore, the glass cone



is purged with humidified air to prevent nasal mucous membranes from drying out in order to maintain olfactory sensitivity.

Two trained sniffers (replaced at 15 min intervals to avoid fatigue and distractions) recorded timing and description of the odors perceived during the elution of the sample extract compounds. Every sample was analyzed in triplicate.

#### **2.4.2. GC-MS**

GC-MS analyses were performed with a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph equipped with an HP-5973 mass selective detector (HP, Palo Alto, USA). Separation was achieved under the same operating conditions described above and using the same columns as in the GC-FID and GCO analyses. The mass spectrometer operated in the electron impact ionization mode (70 eV). Interface, source and quadrupole temperatures were 200 °C, 230 °C and 150 °C, respectively, and the mass range was from 35 to 300 amu. The split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270 °C for 1 min.

#### **2.5. Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA)**

When working with the SPME, the analytes are retained on the fiber so no physical extract is obtained. Therefore, the usual AEDA cannot be applied. In this study, the most odor-active compounds in roasted pistachios were hierarchically classified by an approach to the AEDA (24, 34). It consisted of stepwise reduction of the amount of roasted pistachio (1:4) that was placed into the vial before performing the SPME while a suitable amount of Milli-Q water was added in each dilution to keep constant the headspace/sample ratio. The dilutions were carried out until no odorant was detected by sniffing the highest dilution. Two trained sniffers performed the AEDA experiments and their response (sensitivity) to the individual compounds did not differ, in any case, by more than 2 FD-factors.

#### **2.6. Compounds identification**

The identification of the odorants perceived was based on comparison of three parameters of the unknown odorants with those of the standard compounds analyzed under identical conditions: odor quality perceived at the sniffing port, mass spectra obtained and retention indices determined on the two stationary phases of different polarity employed (CP-WAX 57CB and HP-5). Retention

indices were calculated from the retention times of a series of *n*-alkanes (from 6 to 26 carbon atoms) injected under the same chromatographic conditions.

In some cases, due to the coelution of several compounds with similar aromatic qualities, their perception threshold constituted a helpful tool to determine the real contribution to the aromatic region considered. In these cases, because of the important fatty component of the sample, these thresholds were not determined in water but in a deodorized and distillate vacuum pump oil in order to get a suitable matrix.

### 2.7. Descriptive sensory analysis

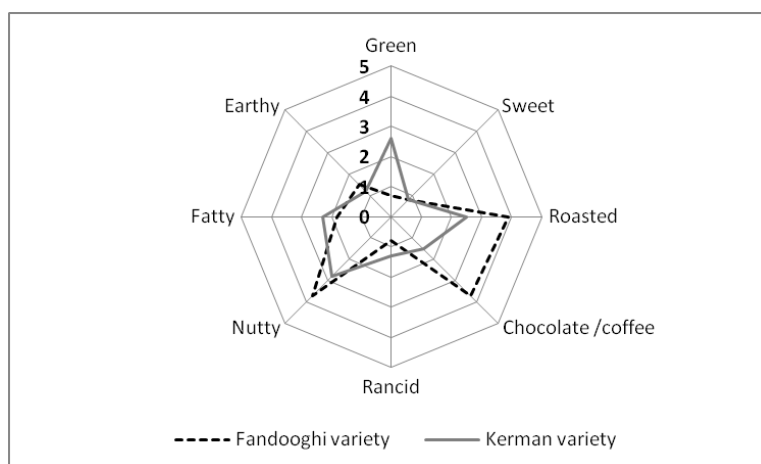
The odor of the two different varieties of fresh roasted pistachios finely ground was evaluated by a panel of 8 trained non-smoker assessors (5 women and 3 men, between 25 and 42 years old), all of them belonging to the Department of Analytical Chemistry of the Rovira i Virgili University. To get a more specific training on the aroma of roasted nuts, panelists were subjected to the following training: during 10 sessions, each lasting 60 minutes, they evaluated an array of different commercial roasted edible nuts (hazelnuts, almonds and pistachios), describing samples odor qualities on the basis of their personal criterion. In that way, multiple odor qualities were achieved and after an intense discussion, panelists finally agreed on a common list of 8 descriptors for pistachio nuts: green, sweet, roasted, chocolate/coffee, rancid, nutty, fatty and earthy.

Finally, assessors evaluated the odor of the two different varieties of roasted pistachios analyzed in this study on a discontinuous scale from 0 (not detected) to 5 (maximum detection) for the 8 descriptors selected: green, sweet, roasted, chocolate/coffee, rancid, nutty, fatty and earthy. Samples (20 g of fresh roasted pistachios finely ground) were single presented to the panelists in dark glass flasks with random coded numbers (each sample was evaluated in triplicate). Sensory analyses were performed in a sensory panel room at 22 °C ± 2. The coefficients of variance of each single panelist for every sample replicates of one sample were less than 10%. To evaluate the panel performance as a whole, one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

The sensory analysis of the two roasted pistachio varieties revealed important differences for some of the descriptors evaluated, as it can be seen in **Figure 1**. Thus, although both cultivars gave comparable intensity values ( $\alpha = 0.05$ ) for the sweet, rancid, fatty and earthy descriptors, the odor

profiles of the two varieties differed significantly ( $\alpha = 0.05$ ) with regard to the green, roasted, chocolate/coffee and nutty descriptors: while Kerman variety presented a higher intensity for “green”, Fandooghi cultivar presented a higher intensity for “roasted”, “chocolate/coffee” and “nutty”, descriptors usually associated with the roasted nut odor. Furthermore, the perception of these three descriptors, especially in this variety, was so high that it disguised the rest of attributes. These results agreed with the ones described in **Table 1**, where almost all the different nutty odors detected for the two pistachio varieties presented a higher FD factor for the Fandooghi.



**Figure 1.** Odor profiles of freshly roasted pistachios

In the same way, when the Fandooghi variety was analyzed by HS-SPME and GC-FID, the chromatographic profile obtained was slightly richer -with more and higher peaks- than the one provided by the Kerman variety. This meant that the Fandooghi variety had a more complex volatile composition than the Kerman cultivar, but both HS-SPME extracts were analyzed by GCO to verify if this higher volatile complexity also implied a greater aromatic response. The results of these analyses confirmed that there was a difference in the number of odor-active regions detected when analyzing the SPME extracts of both varieties by GCO: while 74 different odor-active regions were perceived for the Fandooghi cultivar, only 60 were recorded for the Kerman one. However, nearly all these latest 60 odor-active areas coincided -both in their retention times and the descriptors employed to define them- with different flavor-active regions detected for the Fandooghi variety. In both cases, and as it happens in similar flavor studies when employing a polar column (12, 14), chemical and fruity notes were perceived at lower retention indices, followed by green and earthy notes. At the end of the analysis appeared the lactic and fatty odors, followed by the burned and caramelized ones.

To get a first hierarchical classification of the odorants in roasted pistachio aroma, the volatiles extracted were analyzed by the new approach to the AEDA developed. The results are summarized in **Table 1**, where the odor-active areas with higher FD factors (ranging from 64 to 1024) have been arranged following their retention indices in the polar column. 46 and 41 flavor-active regions with a  $FD \geq 64$  were detected for the Fandooghi and the Kerman varieties, respectively. As it can be seen, the actual potent odorants present in pistachio aroma are almost the same, whatever the pistachio variety analyzed. The main difference with regard to the odorants lies in the perception intensity of some of these compounds, as a high FD factor obtained for a variety does not imply a high FD value for the other cultivar. Indeed, only eighteen flavor-active regions were detected with the same FD factor for the two varieties: eight regions with the FD of 1024 and ten with the FD of 256, while no coincidence between the cultivars was found for the FD of 64. The eight odor-active areas with a FD factor of 1024 were the regions number **2** (malty, bitter almonds), **12** (earthy), **13** (citrus, fresh), **15** (roasted nuts, corn), **19** (rubber, plastic), **22** (rubber, sulfur-like), **28** (anise-like) and **37** (smoky), which were identified by mass spectra, retention indices and the odor of the reference compounds as 2 and 3-methylbutanal (region **2**), octanal (region **13**) and guaiacol (region **37**). The odorants responsible for the earthy, rubbery and anise-like notes were not identified. Regarding region **15**, we positively identified 2 pyrazines (2,6-dimethylpyrazine and 2-ethylpyrazine) that matched with the aromatic quality of this region in both columns used in this study. However, due to the high odor thresholds that these compounds showed in deodorized and distillate oil ( $8000 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $20000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), we assumed that another odor-active molecule should be responsible for the high FD factor that presented this region. Indeed, Chetschik *et al.* (35) demonstrated, very recently, the unimportance of these pyrazines in the overall aroma of peanut. On the other hand, in previous studies related to roasted nuts aroma (12, 14, 35), it was pointed that 2-acetyl-1-pyrroline was responsible for a “roasted, popcorn-like” odor detected at a retention index which coincided with our flavor-active area **15**. Since this compound shows a very low detection threshold value ( $0.053 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (36), even being at very low concentration in roasted nuts (35), it behaves as an important contributor to the overall aroma. This would explain why we could detect it by GCO but not by GC-MS. However, we could not corroborate this identification because its reference standard is not commercially available.

Among the ten flavor-active regions with a FD factor of 256, eight of them were chemically identified as shown in Table 1 -the regions number **1** (malty, solvent-like), **11** (fishy), **14** (mushroom), **17** (sulfur-like), **24** (fatty, green-like), **25** (paper-like), **32** (blue cheese, sweaty) and **38** (sweety)- and only the regions number **30** (green pepper, earthy) and **35** (fatty, flowery) were not positively identified. However, with regard to the odor-active region number **35**, we found the compound

methyl laurate as the possible responsible of this aromatic region. This hypothesis is due to the fact that the reference standard compound coincided with this region both in its odor and in its RI in both chromatographic columns used in this study. Moreover, although the GC-MS was not able to identify this compound, we found its most abundant  $m/z$  ratios at the retention time where this odor eluted when analyzing the spectrum. These facts, together with its low perception threshold ( $150 \mu\text{g L}^{-1}$  in deodorized and distillate oil), led us to this assignment.

Although, as it can be seen in **Table 1**, each aroma perceived during the GCO analysis is generally due to a single odorant, we found two aromatic regions which were generated by a mixture of compounds: number **21** (cooked potato) and **24** (fatty, green-like). The first one was positively identified as a mixture of 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5(or 6)-dimethylpyrazine and methional (region **21**), and the second one as a mixture of 2,3-diethyl-5-methylpyrazine, 3,5-diethyl-2-methylpyrazine and 2-acetylfuran (region **24**). Related to the region **21**, it could be thought that its high FD values were due mainly to methional because of its lower perception threshold in oil ( $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$  for methional and  $5\text{-}50 \mu\text{g L}^{-1}$  for the pyrazines identified). However, the greater chromatographic peaks of the pyrazines and also the fact that the “cooked potatoes” note started to be perceived slightly before methional eluted from the column, allowed us to ensure that this aromatic region was due to the mixture of the three compounds. On the other hand, concerning to the aromatic region **24**, besides two pyrazines also 2-acetylfuran was positively identified. Nevertheless, although its odor quality coincided with the one detected in the region considered, its high perception threshold in oil ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$  when using a distilled and deodorized oil) was a good indicator that this compound was not responsible of such high FD factors. Therefore, we concluded that the aromatic region **24** was only due to the mixture of the two pyrazines identified.

When analyzing the differences between varieties, six odor-active regions were detected for the Fandooghi cultivar but not for the Kerman: **3** (fruity, strawberry), **5** (strawberry), **10** (fruity), **23** (anise-like, fennel), **39** (roses) and **43** (disgusting, animal), which correspond to ethyl propanoate (region **3**), 2-methylpropyl acetate (region **5**), (E)-2-pentenal (region **10**), 2-phenylethanol (region **39**), octanoic acid (region **43**) and one unknown odorant (region **23**). On the contrary, only the flavor-active area number **26** (cheese, disgusting), that was identified as isobutyric acid, was detected for the Kerman but not for the Fandooghi variety. Furthermore, while 22 odor-active regions were perceived in the Fandooghi cultivar with a higher FD factor than in the Kerman cultivar, only 6 odors appeared in this second variety with a higher FD factor: **7** (butter), **16** (geranium), **21** (cooked potato), **33** (deep-fried), **41** (metallic) and **42** (sweet, honey), which were identified as 2,3-pentanedione (region **7**), a mixture of 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 2-ethyl-3,5(or 6)-dimethylpyrazine and methional (region **21**) and  $\gamma$ -nonalactone (region **42**). The region number **16**

was not positively identified. With regard to the odor-active region **33** (deep-fried), when using the polar column, we found that this odor-active region could be due to (E,E)-2,4-decadienal but also to (E,E)-2,4-nonadienal because both compounds coeluted. However, although the last one was present among the roasted pistachio volatiles, as well as among the odorants of other roasted nuts (12, 14), the GCO analyses by using the HP-5 column allowed us to identify them separately and we could identify the (E,E)-2,4-decadienal as the responsible of this odor-active region. Regarding number **40** (metallic), it has been related to *trans*-4,5-epoxy-(E)-2-decenal. Although no reference compound is available, the identification was done on the basis of the odor perceived, the retention indices calculated on the CP-WAX and HP-5 stationary phases, the literature (12, 14) and the Flavornet database (37).

From the results obtained, it can be observed that most of the key odorants of roasted pistachio aroma determined in this study have been previously reported as volatile or aromatic compounds in other roasted nuts (10-14). This can lead to the conclusion that there is a group of coincident odorants that influences on the characteristic roasted nut odor and that they are almost the same, whatever the nut considered. However, we should not forget the role played by those specific compounds present in each nut. Only the global perception of their own characteristic notes, together with the different perception intensity of the coincident compounds provides the aromatic differences among nuts and among varieties of the same type of nut.

#### **Acknowledgments**

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (project AGL2007-61550 and AGL2010-19688) and also by the Ingenio 2010 program from the Spanish Ministry of Industry in a CENIT project called MET-DEV-FUN and La Morella Nuts S.A. (Reus, Catalonia, Spain), which led the consortium of this project.

**Table 1.** Main odorants found in roasted pistachio nuts with FD  $\geq$  64 for at least one of the varieties analyzed

odour-active regions	RI on		odour description	FD factor		compound	MSD			RI	odour	previously reported <sup>d</sup>
	CP-WAX	HP-5		F	K		F	K				
	<i>a</i>	<i>a</i>		256	256		X	X				
1			malty, solvent-like	256	256	isobutanol	X	X	X	X	X	
2	915	<i>a</i>	malty, bitter almonds	1024	1024	2-methylbutanal 3-methylbutanal	X	X	X	X	X	11, 12, 14
3	941	nd	fruity, strawberry	64	nd	ethyl propanoate			X	X	X	
4	943	<i>b</i>	butter	1024	256	diacetyl	X	X	X	X	X	12, 14
5	968	773	strawberry	256	nd	2-methylpropyl acetate			X	X	X	
6	983	801	fruity	256	64	ethylbutyrate			X	X	X	
7	991	702	butter	64	1024	2,3-pentanedione	X	X	X	X	X	11, 12, 14
8	994	843	fruity, apple	1024	256	ethyl 2-methylbutyrate			X	X	X	11, 14
9	1020	794	green, grass	1024	256	hexanal	X	X	X	X	X	10, 12, 14
10	1076	753	fruity	64	nd	(E)-2-pentenal	X	X	X	X	X	
11	1183	896	fishy	256	256	(Z)-4-heptenal			X	X	X	
12	1195		earthy	1024	1024	unknown						
13	1233	1001	citrus, fresh	1024	1024	octanal			X	X	X	12, 14
14	1243	975	mushroom	256	256	1-octen-3-one	X	X	X	X	X	12, 14
15	1294	920	roasted nuts, corn	1024	1024	2-acetyl-1-pyrroline*			X	X	c	12, 14
16	1314		geranium	256	1024	unknown						
17	1329	965	sulfur-like	256	256	dimethyltrisulfide	X	X	X	X	X	12, 14
18	1343	997	fruity, sweet	256	64	2-ethyl-5-methylpyrazine	X	X	X	X	X	11, 13
19	1369		rubber, plastic	1024	1024	unknown						

<b>20</b>	1388	nd	mushroom	1024	256	1-octen-3-ol	X	X	10, 11
<b>21</b>	1402	1077 1085 907	cooked potato	256	1024	3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine 2-ethyl-3,5(or 6)-dimethylpyrazine methional	X	X c X X	11 11, 12, 14 12, 14
<b>22</b>	1432		rubber, sulfur-like	1024	1024	unknown			
<b>23</b>	1434		anise-like, fennel	1024	nd	unknown			
<b>24</b>	1449	1150 1170	fatty, green-like	256	256	2,3-diethyl-5-methylpyrazine 3,5-diethyl-2-methylpyrazine	X	X c	12, 13
<b>25</b>	1483	1160	paper-like	256	256	(E)-2-nonenal	X	X	12, 14
<b>26</b>	1510	1232	cheese, disgusting	nd	1024	isobutyric acid	X	X	
<b>27</b>	1519	1026	roasted nuts, popcorn	256	16	2-acetylpyridine	X	X	12
<b>28</b>	1537		anise-like	1024	1024	unknown			
<b>29</b>	1561	nd	vomit, lactic	1024	4	butyric acid	X	X	12, 14
<b>30</b>	1572		green pepper, earthy	256	256	unknown			
<b>31</b>	1591	1043	green roses	1024	256	phenylethanal	X	X	10, 12, 14
<b>32</b>	1616	879	blue cheese, sweaty	256	256	2-methylbutyric acid 3-methylbutyric acid	X X	X X	12 12
<b>33</b>	1653	1324	deep-fried	64	256	(E)-2,4-decadienal	X	X	12, 14
<b>34</b>	1715	1098	roasted nuts	1024	64	2-acetyl-2-thiazoline	X	X	12
<b>35</b>	1760	1520	fatty, flowery	256	256	methyl laurate*	X	X	
<b>36</b>	1776	1383	sweet, peach jam	1024	256	β-damascenone	X	X	14
<b>37</b>	1809	1093	smoky	1024	1024	guaiacol	X	X	12, 14
<b>38</b>	1828	1039	sweet	256	256	phenylmethanol	X	X	
<b>39</b>	1865	1119	roses	64	nd	2-phenylethanol	X	X	10, 14





## LITERATURE CITED

- (1) Venkatachalam, M.; Sathe, S. K. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4705-4714.
- (2) Kornsteiner, M.; Wagner, K.-H.; Elmadfa, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem.* **2006**, *98*, 381-387.
- (3) Coates, A. M.; Howe, P. R. Edible nuts and metabolic health. *Curr. Opin. Lipidol.* **2007**, *18*, 25-30.
- (4) Lois, M. T. A.-E; García-Andrade, C. R.; Walther, L. A. Á.-S.; Núñez-Cortés, J. M. The mediterranean diet: a combination of beneficial elements for cardiovascular disease. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 105-108.
- (5) Moodley, R.; Kindness, A.; Jonnaladadda, S. B. Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almonds, Brazil, pecan, macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *J. Environm. Sci. Health Part B* **2007**, *42*, 585-591.
- (6) Küçüköner, E.; Yurt, B. Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217*, 308-310.
- (7) Evaristo, I.; Batista, D.; Correia, I.; Correia, P; Costa, R. Chemical profiling of Portuguese *Pinus pinea* L. nuts. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 1041-1049.
- (8) Elmore, J. S.; Nisyrios, I.; Mottram, D. S. Analysis of the headspace aroma compounds of walnuts (*Juglans regia* L.). *Flavour Fragr. J.* **2005**, *20*, 501-506.
- (9) Alasalvar, C.; Odabasi, A. Z.; Demir, N.; Balaban, M. Ö.; Shahidi, F.; Cadwallader, K. R. Volatiles and flavor of five Turkish hazelnut varieties as evaluated by descriptive sensory analysis, electronic nose, and dynamic headspace analysis/gas chromatography-mass spectrometry. *J. Food Sci.* **2004**, *69*, 99-106.
- (10) Krist, S.; Unterweger, H.; Bandion, F.; Buchbauer, G. Volatile compound analysis of SPME headspace and extract samples from roasted Italian chestnuts (*Castanea sativa* Mill.) using GC-MS. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 470-473.
- (11) Alasalvar, C; Shahidi, F.; Cadwallader, K. R. Comparison of natural and roasted Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) volatiles and flavour by DHA/GC/MS and descriptive sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5067-5072.
- (12) Chetschik, I.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Comparison of the key aroma compounds in organically grown, raw West-African peanuts (*Arachis hypogaea*) and in ground, pan-roasted meal produced thereof. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 10237-10243.

- (13) Vázquez-Araújo, L.; Verdú, A.; Navarro, P.; Martínez-Sánchez, F.; Carbonell-Barrachina, Á. A. Changes in volatile compounds and sensory quality during toasting of Spanish almonds. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2225-2233.
- (14) Burdack-Freitag, A.; Schieberle, P. Changes in the key odorants of Italian hazelnuts (*Coryllus avellana* L. Var. Tonda Romana) induced by roasting. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6351-6359.
- (15) Al-Saghir, M. G. Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* L. (Anacardiaceae) based on morphological data. *Asian J. Plant Sci.* **2010**, *9*, 28-35.
- (16) Dragull, K.; Beck, J. J.; Merrill, G. B. Essential oil yield and composition of *Pistachia vera* "Kerman" fruits, peduncles and leaves grown in California. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 664-668.
- (17) Duru, M. E.; Cakir, A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Harmandar, M.; Izumi, S.; Hirata, T. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three *Pistacia* species. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 170-176.
- (18) Alma, M. H.; Nitz, S.; Kollmannsberger, H.; Digrak, M.; Efe, F. T.; Yilmaz, N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3911-3914.
- (19) Gentile, C.; Tesoriere, L.; Butera, D.; Fazzari, M.; Monastero, M.; Allegra, M.; Livrea, M. A. Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. Var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 643-648.
- (20) Anderson, K. A.; Smith, B. W. Use of chemical profiling to differentiate geographic growing origin of raw pistachios. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 410-418.
- (21) Arena, E.; Campisi, S.; Fallico, B.; Maccarone, E. Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds. *Food Chem.* **2007**, *104*, 403-408.
- (22) Chahed, T.; Bellila, A.; Dhifi, W.; Hamrouni, I.; M'hamdi, B.; Kchouk, M. E.; Marzouk, B. Pistachio (*Pistacia vera*) seed oil composition: geographic situation and variety effects. *Grasas Aceites* **2008**, *59*, 51-56.
- (23) Cadwallader, K. R.; Puangpraphant, S. Flavor and volatile compounds in tree nuts. In *Tree nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects*; Alasalvar, C., Shahidi, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2009; 109-126.
- (24) Aceña, L.; Vera, L.; Guasch, J.; Busto, O.; Mestres, M. Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachio aroma. *J. Chromatogr. A J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 7781-7787.

- (25) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Aroma Compounds. In *Food Chemistry*, third revised edition; Springer: Berlin, Germany, 2004; 342-408.
- (26) Holley, A. Processing information about flavour. In *Flavour in food*, first edition; Voilley, A., Etiévant, P., Eds.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, England, 2006; 36-61.
- (27) Zellner, B. A.; Dugo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1186*, 123-143.
- (28) Mayol, A. R.; Acree, T. E. Advances in Gas Chromatography-Olfactometry. In *Gas Chromatography-Olfactometry. The State of the Art*, first edition; Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T. E., Eds.; ACS Symposium Series, Washington D.C., Washington, 2001; 1-10.
- (29) Ullrich, F.; Grosch, W. Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *184*, 277-282.
- (30) Schieberle, P.; Grosch, W. Evaluation of the flavour of wheat and rye bread crusts by aroma extract dilution analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1987**, *185*, 111-113.
- (31) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145-2148.
- (32) Wardencki, W.; Michulec, M.; Curylo, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2004**, *39*, 703-717.
- (33) Riu, R.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A*, **2006**, *1107*, 240-247.
- (34) Martí, M. P.; Mestres, M.; Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J. Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7861-7865.
- (35) Chetschik, I.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Quantitation of key peanut aroma compounds and pan-roasted peanut meal. Aroma reconstitution and comparison with commercial peanut products. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 11018-11026.
- (36) Czerny, M; Christlbauer, M.; Christlbauer, M.; Fischer, A.; Granvogl, M.; Hammer, M.; Hartl, C.; Moran Hernandez, N.; Schieberle, P. Re-investigation on odour thresholds of key food aroma compounds and development of an aroma language based on odour qualities of defined aqueous odorant solutions. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 265-273.
- (37) Acree, T.; Arn, H. Flavornet and human odor space (latest update 06.25.2004). <http://www.flavornet.org>, accessed August 2010.

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## CAPÍTULO 6

### El aceite de oliva

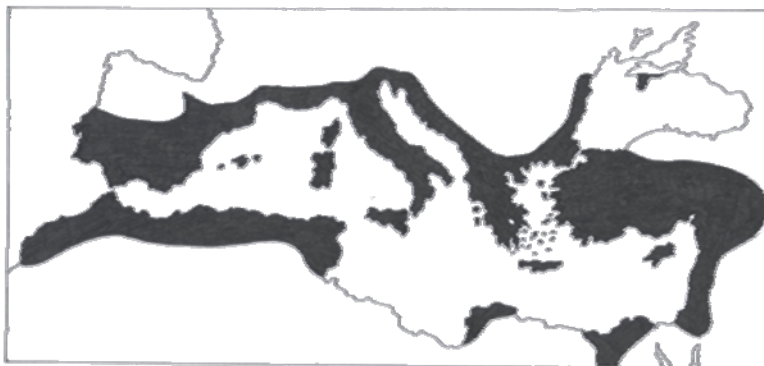


APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## 6.1.- EL ACEITE DE OLIVA

Las distintas civilizaciones que se han desarrollado alrededor del Mar Mediterráneo a lo largo de los siglos han basado su alimentación en los productos derivados del trigo, el olivo y la vid. Es la denominada “tríada mediterránea”: pan, aceite y vino, pero a la que también habría que añadir las legumbres, por el gran peso que han tenido en la alimentación de estos pueblos [1].

Sin embargo, el trigo proviene de Oriente Próximo y la vid, de Asia Central, mientras que las legumbres tienen distintos orígenes en función de la especie de que se trate (Mesopotamia, América o Asia Central), por lo que únicamente el olivo es realmente originario de la cuenca mediterránea [2] (**Figura 6.1**). De ahí que el aceite de oliva sea el más característico de estos alimentos, el que diferencia a la dieta mediterránea del resto de modelos alimentarios, hecho que se resume con claridad en la frase del escritor y poeta francés Georges Duhamel: *“donde el olivo se retira, acaba el mediterráneo”*.



**Figura 6.1.** Distribución del olivo en la cuenca mediterránea

### 6.1.1.- Definición

La palabra “aceite” significa “jugo de la oliva”. Proviene del término arameo “zaytā” y del hebreojudáico “az-zeit”, que derivaron al “azzáyt” del árabe hispánico. Posteriormente, el término evolucionó hasta el “aceite” actual [3], que, de acuerdo



con la Real Academia Española de la Lengua [4], es el líquido graso de color verde amarillento que se obtiene prensando las aceitunas.

En realidad, la palabra aceite se refiere solamente al aceite de oliva virgen, pero se ha terminado generalizando para designar todos los líquidos oleosos obtenidos de las semillas de las plantas.

Según la Reglamentación Técnico-Sanitaria española [5], el aceite de oliva es el aceite procedente únicamente de los frutos de olivo "*Olea europea* L.", con exclusión de los aceites obtenidos con disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza.

### 6.1.2.- Tipos de aceite de oliva

Las legislaciones española y comunitaria han definido expresamente cuáles son los diferentes tipos de aceites de oliva y de orujo de oliva que pueden comercializarse en la Unión Europea, qué características de calidad y pureza deben reunir y cómo deben determinarse estas características [5-8], pudiéndose distinguir tres grandes tipos de aceites: los aceites de oliva vírgenes, el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva (**Figura 6.2**).

**Aceites de oliva vírgenes.** Son todos aquellos aceites obtenidos a partir de las aceitunas exclusivamente por procedimientos mecánicos o por otros procedimientos físicos, pero que impliquen una alteración mínima del producto, y que no sean diferentes del lavado, la decantación, la centrifugación o la filtración. El término "virgen" hace referencia a la ausencia de cualquier tipo de intervención química. De hecho, están excluidos expresamente de esta categoría los aceites obtenidos gracias al uso de disolventes orgánicos, coadyuvantes químicos o bioquímicos, o a procesos de reesterificación, así como los productos que sean mezclas de otros aceites.

Sin embargo, según la recolección, el transporte y el almacenamiento de las aceitunas, por ejemplo, la calidad de estos aceites de oliva vírgenes puede variar. Por ese motivo, dentro de este grupo, se distinguen otros tres tipos (**Figura 6.2**):

- “*Aceite de oliva virgen extra*”. Presenta una acidez libre igual o menor a 0,8<sup>o</sup>, sin defectos organolépticos, y con un atributo frutal de aceitunas. Es el mejor de los aceites vírgenes, con un valor nutricional y gastronómico máximo.
- “*Aceite de oliva virgen*”. Presenta una acidez libre máxima de 2<sup>o</sup>, y su valoración organoléptica de los defectos debe ser igual o inferior a 2,5 puntos (en una escala de 10), y con un atributo frutal positivo. Su valor nutricional también es máximo, y sólo los catadores altamente cualificados son capaces de detectar sus casi imperceptibles irregularidades.
- “*Aceite de oliva virgen lampante*”. Presenta una acidez libre superior a 2<sup>o</sup> y un sabor defectuoso y/o un defecto organoléptico superior a 2,5 puntos. No puede ser consumido y debe ser sometido a un proceso de refinado, tras lo que se obtiene el aceite de oliva refinado. Este aceite de oliva refinado no puede comercializarse, pero sí usarse en la elaboración del aceite de oliva.

**Aceite de oliva.** Es una mezcla de aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen extra o virgen. Su acidez varía en función del tipo de aceite de oliva virgen con el que se enriquece, pudiendo ser 0,4<sup>o</sup> (si es de menor sabor), o de 1<sup>o</sup> (si es de mayor sabor). No posee ni el valor sensorial ni el nutricional que caracteriza a los aceites vírgenes.

**Aceite de orujo de oliva.** Es el aceite contenido en el orujo, la parte sólida que queda tras la obtención del aceite virgen, y formado por la piel, los restos de pulpa agotada y el hueso de las aceitunas. Después de extraerlo con disolventes, el aceite de orujo bruto, o crudo, es sometido a un proceso de refinado. Al aceite de orujo refinado que se consigue se le adiciona aceite de oliva virgen para mejorar sus cualidades. Finalmente, pasa a comercializarse como aceite de orujo de oliva.

Mientras que las diferencias entre un aceite de oliva virgen extra y otro virgen son únicamente de carácter sensorial (ya que ambos son iguales desde una perspectiva nutricional), el aceite de oliva presenta un valor sensorial, gastronómico y nutricional sensiblemente inferior, comparable al del aceite de orujo de oliva.

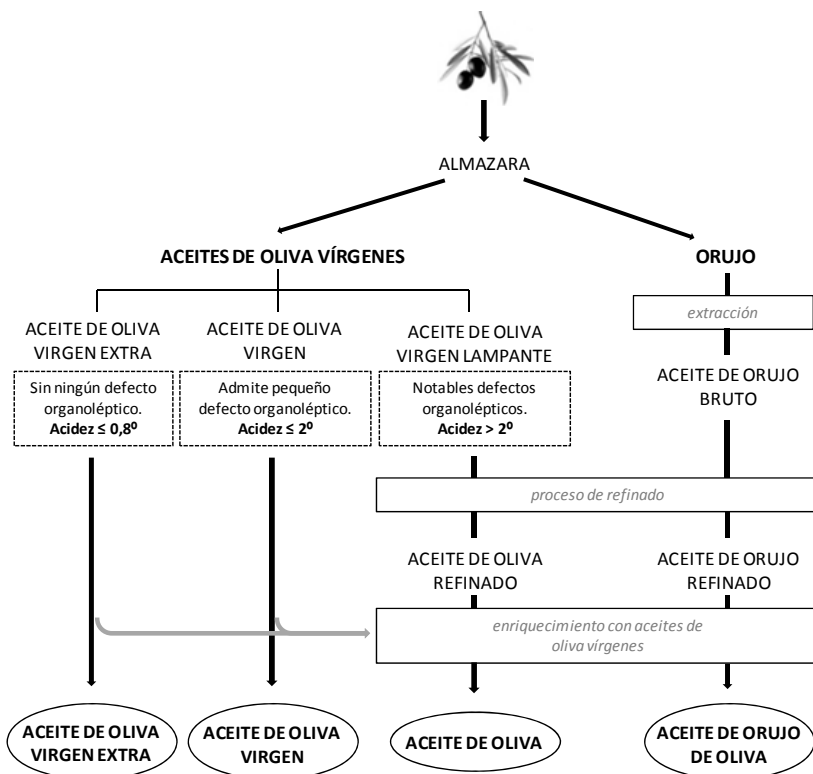


Figura 6.2. Tipos de aceite de oliva

### 6.1.3.- Métodos de obtención del aceite de oliva

Para obtener un aceite de calidad es necesario partir de unas aceitunas enteras, sanas y maduras. Indudablemente, factores como el tipo de variedad y el estado de maduración de las aceitunas, las condiciones climáticas y edafológicas, así como la irrigación o fertilización que soporta el olivo, junto con el sistema de recolección de los frutos (manual o mecánica), afectan a la calidad de las aceitunas y, por tanto, a la

del aceite. Pero los procedimientos aplicados durante todo el proceso de extracción también influyen decisivamente en la calidad del producto final [2].

### **6.1.3.1.- Obtención de los aceites de oliva vírgenes**

A la entrada de la almazara hay que clasificar los frutos en función de su variedad, de su procedencia del árbol o del suelo y de su estado fitosanitario, de forma que se procesan separadamente los de cada clase. Además, es muy importante que las aceitunas entren limpias, sin restos de hojas y ramas, o piedras y tierra [9, 10].

A continuación hay que llevar a cabo la molienda o triturado lo más rápidamente posible, para evitar procesos fermentativos sobre el fruto, que elevan la acidez del aceite que contienen y generan malos sabores y olores. Si hubiera que almacenar algunos frutos (uno o dos días, como máximo), es aconsejable hacerlo en un lugar fresco y ventilado y siempre los de peor calidad, para procesar inmediatamente las aceitunas mejores [2, 10].

El fin de la molienda es liberar el aceite de las estructuras celulares que lo contienen por rotura de los tejidos. En la antigüedad, este proceso se hacía a mano en recipientes de piedra esféricos o cónicos. Actualmente se utilizan sistemas de tracción mecánicos en molinos de materiales inertes, de acero inoxidable o piedra [10, 11].

La pasta obtenida tras el triturado se bate entonces con máquinas batidoras provistas de paletas o hélices que giran a baja velocidad para evitar emulsiones. De esta manera se produce la coalescencia entre las gotitas de aceite presentes para generar gotas grandes. Es importante que este proceso se lleve a cabo a temperaturas moderadas y dentro de unos límites muy estrictos, y no prolongarlo excesivamente en el tiempo. Así se evita la pérdida de volátiles, que se inicien procesos de oxidación y la disminución del contenido total de polifenoles [2, 9-11].

Tras el batido se procede a la separación de la fase sólida (orujo) de la fase líquida, mediante presión, centrifugación o una combinación de ambos sistemas. En

algunos casos, antes de aplicar estos métodos de separación, se realiza una extracción parcial del *aceite suelto*, el menos retenido por la pasta, aprovechando la diferente tensión superficial del aceite y el agua de vegetación [2, 9]. Pero el porcentaje de aceite que se consigue así, en relación con la producción total, es muy pequeño.

De entre los sistemas de separación, el más antiguo y utilizado es el de presión. En él, la pasta se coloca en capas finas sobre discos de material filtrante, los denominados capachos. Estos capachos van guiados por una aguja central y se disponen unos sobre otros, formando un conjunto cilíndrico (*cargo*) que se sitúa en una vagoneta. La presión aplicada sobre el cargo provoca la salida de los líquidos, mientras que los sólidos quedan retenidos en los capachos. La estructura granular de la pasta y los capachos actúan de filtros, y los líquidos obtenidos (el aceite y el agua de vegetación) se recogen en la vagoneta. En estos casos hay que tener cuidado con la presión que se aplica: presiones de hasta  $40 \text{ kg/cm}^2$  proporcionan los mejores aceites. Con presiones superiores ( $55\text{-}65 \text{ kg/cm}^2$ ) se logra un mayor rendimiento, pero aceites de calidad sólo aceptable. También hay que lavar con frecuencia los capachos para evitar el desarrollo de fermentaciones [2, 9, 10].

Actualmente, la separación del orujo de la fase líquida tiende a hacerse por procedimientos continuos de centrifugación de masas, entre los que se distinguen los de tres y los de dos fases. En los primeros, la pasta se diluye con agua templada y se inyecta en centrifugadoras de eje horizontal, donde las fases se separan por la diferente densidad de las fases. Por un lado se recoge el orujo (materia seca casi desgrasada) acompañada de humedad, por otro, el alpechín (agua de vegetación) con algo de aceite y, por otro, el aceite, con algo de humedad. En los sistemas de dos fases no se adiciona agua a la pasta por lo que, tras la centrifugación, únicamente se recogen el aceite (con algo de humedad) y el orujo (que contiene el agua de vegetación de las aceitunas) [9, 10].

Una vez obtenida la fase líquida que contiene el aceite, es necesario separar el agua de vegetación y los sólidos en suspensión. Puede hacerse por gravedad,

utilizando depósitos decantadores, o por centrifugación. El primer proceso es más lento, con prolongados tiempos de contacto entre el aceite y el alpechín. Además, proporciona aceites de mayor acidez y menor estabilidad oxidativa, por lo que se prefiere el método de la centrifugación, que permite trabajar en continuo [2, 9, 10].

Finalmente, el aceite se almacena en la almazara durante un tiempo más o menos largo hasta su envasado y comercialización. Los depósitos más adecuados para almacenarlo son los que evitan grandes cambios de temperatura y la influencia del aire y la luz, y que están hechos de materiales inertes al aceite [9, 10].

### **6.1.3.2.- Obtención del aceite de orujo bruto**

El orujo que queda tras el molido, el batido y la separación de las fases presenta un contenido variable de agua (20-70%) y aceite (2,5-8%), en función del sistema por el que se haya obtenido el aceite de oliva virgen. Para extraer el aceite residual que contiene, es necesario secar dicho orujo inmediatamente después de su obtención y triturarlo, para aumentar así su superficie de contacto. A continuación se le inyecta un disolvente precalentado, generalmente hexano, que extrae el aceite. El disolvente se calienta para aumentar la eficacia de la extracción. La mezcla obtenida se destila con arrastre de vapor, de forma que se elimina el disolvente. El aceite de orujo de oliva crudo que se consigue pasa a ser refinado [2, 10, 11].

### **6.1.3.3.- Obtención del aceite de oliva y del aceite de orujo refinados**

El aceite de oliva virgen lampante y el aceite de orujo bruto tienen que ser sometidos a un proceso de refinación o rectificación para ser aptos para el consumo. Este proceso puede comprender métodos físicos, químicos o una combinación de ambos, y su objetivo es eliminar los compuestos responsables de las características organolépticas desagradables (color, olor y sabor), de la elevada acidez y de la poca estabilidad oxidativa. Para ello, se realiza una serie de procesos (parcial o totalmente): el desgomado, la neutralización, el lavado, la decoloración, la desodorización y el

desmargarinado, que dan lugar al aceite de oliva y al aceite de orujo refinados [2, 10, 11].

#### **6.1.3.4.- Obtención del aceite de oliva y del aceite de orujo de oliva**

Los aceites procedentes del refinado presentan un color muy pálido y muy baja acidez, son poco viscosos, y tienen poco o ningún sabor y olor que recuerden a la aceituna. Además, también han perdido componentes nutricionales importantes, como los antioxidantes. Con el objetivo de mejorar sus características organolépticas y nutricionales, se les adiciona entonces una cierta cantidad de aceite de oliva virgen, entre un 10 y un 20% (normalmente, por debajo del 15%). De esta forma, se obtienen los productos comercializados con el nombre de “aceites de oliva” y “aceites de orujo de oliva”. Suelen ser suaves, agradables de sabor, aunque poco intenso, y se caracterizan por su homogeneidad a lo largo de las campañas y durante todo el año [2, 10].

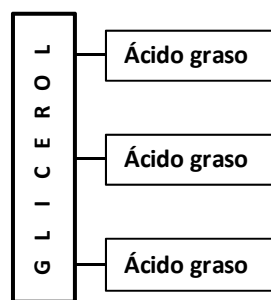
## **6.2.- EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

El aceite de oliva virgen realmente es el zumo de las aceitunas, y el único aceite que puede consumirse como sale del fruto. Las características que presenta dependen de la variedad de aceituna que se emplee y de los procedimientos de elaboración aplicados, pero, si se siguen unos procesos de obtención adecuados, el producto se mantiene sin alteración del sabor, de los aromas y de las vitaminas que el aceite contenía en la aceituna.

### **6.2.1.- Composición química**

El aceite de oliva está compuesto por una fracción mayoritaria de tipo oleoso que representa cerca del 98,5% del total (fracción saponificable), y otra fracción minoritaria no oleosa (fracción insaponificable).

La *fracción saponificable* es la constituida por los triglicéridos y los ácidos grasos libres. Los triglicéridos, tal y como se muestra en la **Figura 6.3**, son ésteres de los ácidos grasos y el glicerol. Estos ácidos grasos se caracterizan por tener un grupo ácido en uno de sus extremos y un número par de átomos de carbono en su cadena carbonada (que oscila entre 12 y 22) [1, 2, 11].



**Figura 6.3.** Estructura química genérica de un triglicérido

Además, la mayor parte de los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son insaturados, es decir, cuentan con dobles enlaces en su estructura. Estas insaturaciones son las responsables de las características especiales del producto final. Por un lado, hacen que disminuya su punto de fusión, de ahí que el aceite sea líquido a temperatura ambiente, pero también lo vuelven más inestable frente a los distintos procesos de alteración, como la oxidación (vulgarmente llamada “enranciamiento”). Por otro, le aportan su gran importancia biológica, ya que estos compuestos, al no ser sintetizados por el organismo, deben ser ingeridos mediante la dieta [2].

Ácido graso	Contenido % (en relación con el total)	Átomos de C: insaturaciones	Posición dobles enlaces	Tipo
Oleico	61-83	18 : 1	9	monoinsaturado
Palmítico	7-18	16 : 0	-	saturado
Linoleico	2-18	18 : 2	9 y 12	diinsaturado
Estearico	0,5-5	18 : 0	-	saturado
Palmitoleico	0,3-3	16 : 1	9	monoinsaturado
Linolénico	< 1,5	18 : 3	9, 12 y 15	triinsaturado

**Tabla 6.1.** Distribución y características de los ácidos grasos en el aceite de oliva



Los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva se detallan en la **Tabla 6.1**, donde también se especifican el número de dobles enlaces que contiene cada uno y la posición que ocupan en la cadena carbonada. Los porcentajes en los que aparecen están referidos al total de ácidos grasos, y son el mínimo y el máximo que establece la legislación para cada uno de ellos [5]. Las variaciones en la composición de estos ácidos que se encuentran en los aceites se deben al tipo de aceitunas empleadas, el estado de maduración, las condiciones ambientales, etc. [1, 2, 11].

Por su parte, la *fracción insaponificable* representa una parte mínima del aceite de oliva (1,5%). En ella encontramos compuestos con estructuras químicas muy diversas, responsables de la estabilidad del aceite y de sus características organolépticas, así como de ciertos efectos beneficiosos que este producto tiene sobre nuestro organismo [1, 2].

Algunos de estos compuestos son hidrocarburos, entre los que destacan el escualeno y los carotenos. El primero es el más abundante (90% del total) y se cree que es el responsable de la baja incidencia del cáncer en las poblaciones mediterráneas [12]. Entre los segundos se encuentran el  $\beta$ -caroteno (precursor de la vitamina A) y el licopeno, ambos con carácter antioxidante y responsables del color de los aceites junto a las clorofilas.

Otro grupo importante de compuestos en el aceite de oliva lo constituyen los esteroides, entre los que el  $\beta$ -sitosterol es el mayoritario, y cuya acción está relacionada con una disminución en la absorción del colesterol alimentario [13]. Asimismo, encontramos alcoholes terpénicos, como el eritrodiool, que se cree que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y vasodilatadoras.

En cuanto a los tocoferoles, el predominante es el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Estos compuestos también tienen propiedades antioxidantes y protegen a los aceites frente a la oxidación. Asimismo, cabe destacar los compuestos fenólicos o polifenoles, cuyas

acciones biológicas van desde inhibir la nitrosación o atrapar especies oxigenadas, hasta quelar iones metabólicos, además de evitar la oxidación [14].

Finalmente, dentro de esta fracción insaponificable, y como ya se verá más adelante, también hay un grupo de compuestos, principalmente con 5 y 6 átomos de carbono en su estructura, con gran influencia sobre las características organolépticas del aceite de oliva, especialmente sobre el aroma.

### **6.2.2.- Criterios de calidad**

El aceite contenido en el fruto constituye el prototipo de calidad, la cual varía según la variedad y la zona geográfica donde se produzca la aceituna. Tradicionalmente, los criterios de calidad se determinaban por catadores expertos, que catalogaban el aceite en función de su flavor (olor, gusto y sabor), color y aspecto. Es la denominada *calidad subjetiva*. Actualmente, a esta evaluación de los caracteres organolépticos se le suma la determinación de ciertos parámetros químicos relacionados con el deterioro de los aceites, y que constituyen la *calidad objetiva* [9].

#### **6.2.2.1.- Parámetros químicos**

Los parámetros químicos de calidad más importantes de los aceites de oliva son el grado de acidez y la oxidación.

El *grado de acidez* mide la intensidad de los fenómenos de hidrólisis que se hayan producido en los triglicéridos, fundamentalmente por la acción de unas enzimas presentes en el propio sustrato, las lipasas. En las aceitunas, estas enzimas no están en contacto con el aceite, por lo que no pueden actuar. Pero si las prácticas de obtención del aceite no son las adecuadas, los tejidos que lo contienen se rompen antes de tiempo. Entonces, lipasas y aceite se juntan, y las primeras pueden destruir el enlace éster de los triglicéridos del segundo, liberando los ácidos grasos [2].

El índice o grado de acidez es la medida de los ácidos grasos libres presentes en el aceite, expresada en porcentaje de ácido oleico. Es un parámetro utilizado para la

clasificación de los aceites, como se ha explicado anteriormente. También es capaz de limitar su comercialización: los aceites con una acidez superior a 2<sup>o</sup> no pueden usarse directamente para la alimentación humana, antes deben ser refinados [2, 9, 11].

Respecto a la *oxidación*, se produce por la inestabilidad que los dobles enlaces de los ácidos grasos introducen en las moléculas y es la responsable del enranciamiento de los aceites que modifica sus características organolépticas. El grado de oxidación se determina mediante el índice de peróxidos y distintas medidas de absorbancia en la zona ultravioleta del espectro ( $K_{232}$  y  $K_{270}$ ).

Existen algunos agentes externos (la luz, la temperatura o ciertos metales) que activan la molécula del ácido graso, al actuar como catalizadores. Así, en una primera etapa se forman radicales libres, capaces de reaccionar en cadena con el oxígeno del aire para originar radicales peróxidos e hidroperóxidos. En una segunda etapa, los peróxidos formados se rompen, dando lugar a los distintos compuestos volátiles (aldehídos, cetonas, etc.), responsables del cambio en el aroma del aceite rancio. Sin embargo, este proceso se ve retardado por la presencia de los antioxidantes (especialmente, los tocoferoles), que actúan como protectores y aumentan la estabilidad del aceite [2, 15].

El índice de peróxidos es el método más utilizado para medir la cantidad total de hidroperóxidos, que son los primeros productos de oxidación. Por tanto, es un indicador de la oxidación inicial del aceite. Se expresa en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite, y su valor debe ser inferior a 20 para los aceites vírgenes [9, 11, 15].

Por su parte, las medidas  $K_{232}$  y  $K_{270}$  indican el estado oxidativo y la adulteración del aceite de oliva. Durante la formación de los radicales peróxidos e hidroperóxidos, así como durante el refinado, se produce un cambio en la configuración de los dobles y triples enlaces de estas especies, de manera que se terminan obteniendo sus formas conjugadas. Mientras que los dienos conjugados absorben a 232 nm, los trienos

conjugados lo hacen a 270 nm [9, 11, 15]. De esta forma, valores bajos de absorbancia a estas longitudes de onda corresponden a aceites de buena calidad. Por ejemplo, para que un aceite sea considerado virgen, debe presentar un  $K_{232} \leq 2,50$  y un  $K_{270} \leq 0,25$ .

### 6.2.2.2.- Evaluación sensorial

La evaluación de las características organolépticas de un aceite es un criterio básico para determinar su calidad. El color, el sabor y el aroma son los parámetros principales que se evalúan, y tanto el vocabulario que debe emplearse en el análisis sensorial [16], como las copas [17] y el tipo de sala de cata [18] en las que debe llevarse a cabo la degustación, así como la metodología a seguir [19] y la selección, entrenamiento y control de los catadores [20], han sido especificados por el Consejo Oleícola Internacional (COI) con el objetivo de establecer un método normalizado y objetivo de análisis del aceite de oliva virgen [21], método que ha sido aceptado por las legislaciones española y comunitaria.

El color de los aceites de oliva vírgenes varía entre el amarillo claro y un verde más o menos intenso, en función del contenido en clorofilas y carotenoides. Aunque se puede determinar instrumentalmente, su evaluación suele realizarse de forma sensorial. Por su parte, sabor y aroma, tal y como ya se ha visto a lo largo de la memoria de esta tesis doctoral, están estrechamente relacionados, y en la actualidad sólo pueden evaluarse con garantías mediante paneles de catadores.

Estos paneles de catadores, adecuadamente seleccionados y entrenados, están constituidos por un mínimo de 8 y un máximo de 12 miembros. Los guía un jefe de panel, que es quien codifica y suministra las muestras, recoge los formularios cumplimentados y realiza un estudio estadístico con los resultados. Esto le permite establecer la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen, que puede ser irreprochable, bueno o defectuoso, y que, junto con el resto de pruebas de calidad, permite clasificarlo en virgen extra o virgen [9, 10, 22].

La cata se lleva a cabo en copas de cristal coloreado de dimensiones establecidas, y a una temperatura próxima a los 28 °C (la más adecuada para percibir los aromas). Cada catador se sitúa en una cabina, sentado, aislado, en un ambiente relajado, y debe anotar las sensaciones olfativas, gustativas, táctiles y quínicas (presión aplicada a la muestra en la cavidad bucal) que experimenta ante cada muestra. También debe señalar la presencia de las distintas cualidades y defectos, valorando su intensidad sobre una escala continua de 10 cm, donde 0 es la ausencia total de un atributo y 10 corresponde a la intensidad máxima [2, 9, 10, 22].

Los atributos positivos que los paneles oficiales de catadores de aceite de oliva virgen valoran de entre todos los atributos sensoriales son los siguientes [2, 22]:

- Atributos aromáticos principales:

*Afrutado de aceituna*: aroma que recuerda a la aceituna, más o menos verde, según su grado de maduración.

*Verde*: aroma que recuerda a la hierba recién cortada o a las hojas del olivo.

- Atributos aromáticos secundarios: únicamente pueden identificarse en aceites vírgenes especialmente bien elaborados o que provengan de aceitunas de máxima calidad. Recuerdan a distintas frutas y verduras, como la manzana, los frutos rojos maduros, la almendra, el hinojo, la nuez, ...

- Atributos de sabor:

*Amargo*: sabor básico que se identifica al final de la cavidad bucal.

*Picante*: sensación táctil de picor que se siente en la garganta.

*Astringente*: sensación de sequedad en la boca a causa de la pérdida momentánea de saliva.

*Dulce*: sabor básico que se identifica en la lengua, potenciado por la ausencia de sustancias amargas.

En cuanto a los atributos negativos, los principales defectos que los paneles oficiales de catadores valoran son agrio, avinado/avinagrado, rancio, metálico,

hongos, moho/humedad o suciedad. Sus orígenes son varios, desde el estado en el que las aceitunas entran en la almazara, hasta el proceso de extracción y el almacenamiento del aceite, incluyendo el tiempo que pasa hasta que el producto es consumido [22].

### **6.2.3.- Efectos funcionales del aceite de oliva**

El aceite de oliva virgen es una importante fuente nutricional para el ser humano, además de un factor preventivo en muchas enfermedades relacionadas con la nutrición, como son la obesidad abdominal, los elevados niveles de triglicéridos y de colesterol “malo” (LDL), la resistencia a la insulina o la intolerancia al azúcar, la presión arterial alta, etc. Su valor biológico y terapéutico está relacionado con su estructura química, y los distintos estudios realizados sobre sus efectos beneficiosos deben contemplarse siempre en relación a las respuestas que generan los aceites de semillas [1, 2, 10, 11, 23].

El aceite de oliva virgen es un alimento único. En primer lugar, por los ácidos grasos que componen los triglicéridos, monoinsaturados en su mayoría, frente a los saturados y los poliinsaturados que constituyen las grasas animales y los aceites de semillas, respectivamente. Estos ácidos grasos monoinsaturados son mucho más estables que los poliinsaturados ante los procesos oxidativos. Y, en segundo lugar, por sus componentes minoritarios, entre los que destacan los tocoferoles, especialmente el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E, el caroteno (precursor de la vitamina A) y los polifenoles, con importantes funciones antioxidantes.

De esta manera, el aceite de oliva ha demostrado ser el mejor tolerado por el estómago, con efectos beneficiosos sobre el estreñimiento crónico y las úlceras gástricas, a la vez que favorece la actuación de la vesícula biliar. Del mismo modo, un consumo constante y adecuado de aceite de oliva virgen reduce la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, ya que, tanto el ácido oleico (principal ácido graso monoinsaturado del aceite de oliva), como los compuestos

antioxidantes, tienen efectos protectores y son capaces de reducir la aterosclerosis. Con respecto a los procesos cancerígenos, en los que están implicados fenómenos oxidativos, algunos estudios relacionan la ingesta de aceite de oliva virgen con la disminución de la aparición de ciertos tipos de cáncer, por la acción de los compuestos antioxidantes. Asimismo, este producto básico de la dieta mediterránea mejora la respuesta inmunológica, ayuda a controlar el nivel de glucosa en sangre y, gracias a su acción positiva sobre el estado oxidativo celular, incide directamente sobre el envejecimiento, ralentizándolo, lo que a su vez repercute sobre todas aquellas enfermedades degenerativas asociadas a él [1, 2, 10-14, 23].

### **6.3.- EL AROMA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN**

El aroma característico del aceite de oliva virgen, recién obtenido y de calidad, está constituido por volátiles pertenecientes a diversas familias (aldehídos, alcoholes, cetonas, ésteres...) que se producen, principalmente, a través de distintas rutas bioquímicas [24, 25]. Estos compuestos aromáticos, que forman parte de la fracción insaponificable del aceite, se generan durante las primeras fases de extracción en la almazara (el triturado y el batido) y a partir de los componentes de las aceitunas [2].

Analizando la fracción aromática del aceite de oliva virgen, es interesante comprobar que el 60-80% de la misma está constituida por compuestos C5 y C6, independientemente de la variedad y zona de producción [26]. Esto se debe al mecanismo de formación de estas sustancias, que está relacionado con la acción de algunas enzimas sobre los ácidos grasos linoleico y linolénico [27]. Estos ácidos grasos forman los lípidos de las membranas celulares de los frutos y se rompen durante la molienda, lo que permite que las enzimas lipoxigenasa e hidroperóxido liasa puedan actuar sobre ellos. Estas enzimas oxidan y escinden, respectivamente, estos ácidos grasos poliinsaturados liberados, de manera que se generan aldehídos con 5 ó 6 átomos de carbono en su estructura. Estos aldehídos son posteriormente reducidos a

alcoholes por las alcohol deshidrogenasas y, en última instancia, la alcohol aciltransferasa esterifica dichos alcoholes hasta producir ésteres [25].

El análisis del aroma del aceite de oliva ha sido estudiado por diversos investigadores desde la década de los 70. Inicialmente, el objetivo era identificar los compuestos responsables del aroma [28-30], pero desde un principio se vio que los aceites procedentes de distintas regiones, aunque con una composición volátil cualitativa similar, diferían notablemente en su composición cuantitativa [29, 30]. Gracias a este hecho, pasó a caracterizarse el aroma del aceite de oliva para averiguar el efecto que sobre él ejercen distintas variables (variedad, climatología, procesos tecnológicos, etc.) [31].

De este modo, el estudio de los compuestos volátiles ha permitido discriminar los aceites en función de la variedad y el estado de maduración de las aceitunas [32], de la calidad, la variedad y el origen geográfico [33], o, incluso, en función de los métodos de extracción empleados [34]. De la misma manera, estos compuestos volátiles han podido relacionarse con los atributos sensoriales que presenta el producto final [26].

Parte de las investigaciones se han centrado también en analizar el origen de los compuestos aromáticos, estudiando para ello las enzimas implicadas en las distintas rutas metabólicas [27, 35, 36]. Pero no sólo interesa conocer cuál es el origen de las sustancias responsables del aroma: la evolución de esos odorantes a lo largo de la vida útil del producto también constituye un importante campo de estudio, dada su estrecha relación con la calidad organoléptica.

Existen distintos factores capaces de alterar el perfil aromático del aceite de oliva, entre los que destacan la luz, el oxígeno, la temperatura y la presencia de metales [11]. Todos ellos provocan un incremento de la oxidación, cuyo efecto más importante sobre las características sensoriales es la aparición de olores indeseables por el desarrollo de ciertos productos secundarios de oxidación volátiles [15, 37].



Estos compuestos pueden ser empleados como indicadores del estado oxidativo del aceite y, por tanto, de su calidad [38-40]. Sin embargo, también se ha demostrado que el uso de atmósferas protectoras es capaz de mejorar la estabilidad y reducir los efectos de la oxidación [41, 42].

Estos procesos se dan principalmente durante el almacenamiento, por lo que es interesante conocer cuál es su evolución en este período de tiempo, con objeto de controlarlos y garantizar la estabilidad y calidad del aceite de oliva [43]. Pero la gran mayoría de los trabajos realizados hasta ahora han simulado las condiciones generalmente implicadas en este almacenamiento, forzándolas para acelerar el proceso [37, 38, 40]. Existen muy pocas investigaciones en las que se haya hecho un seguimiento del proceso natural [44].

Por ese motivo, en el trabajo que se expone a continuación y que ha sido enviado a la revista *Food Control* para su publicación, se consideró interesante evaluar los efectos que un almacenamiento natural, no forzado, tiene sobre el aroma y los parámetros químicos de calidad del aceite de oliva virgen, a la vez que se estudiaba la acción ejercida por distintas atmósferas protectoras [45]. Además de los tradicionales parámetros químicos de calidad y de la evaluación sensorial, se analizaron los compuestos volátiles implicados en el aroma del producto por cromatografía de gases-olfatometría (GCO). De esta manera, se ha podido establecer cuál es la evolución individual de cada compuesto aromáticamente activo a lo largo de todo un año, que, dado el carácter anual de la producción del aceite de oliva, es lo que se considera su período normal de consumo y vida útil.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mataix Verdú, J., Barbancho Cisneros, F. J. *El aceite de oliva, alma del mediterráneo*. Jaén: Instituto de Estudios Giennenses (Diputación de Jaén), Universidad de Jaén (Servicio de Publicaciones); 2008.
- [2] Boatella Riera, J., Contreras, J., coordinadors. *Els olis d'oliva de Catalunya*. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca, Edicions 62, S. A.; 2006.
- [3] Solà Alberich, R. El aceite de oliva. En: Rodríguez Pozo, Á., editor. *Dieta mediterránea y salud*. Lérida: Edicions de la Universitat de Lleida; 1999, p. 39-46.
- [4] Rae.es, Real Academia Española [Internet]. Madrid: Rae.es; [acceso 14 de enero de 2011]. Disponible en: <http://www.rae.es>.
- [5] Presidencia del Gobierno (1983). Real Decreto 308/1983 de 25 de enero, Boletín Oficial del Estado núm. 44 de 21 de febrero, por el que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria de aceites vegetales comestibles.
- [6] Comisión (1991). Reglamento (CEE) 2568/1991 de 11 de julio, Diario Oficial Legislación núm. 248 de 5 de septiembre, por el que se establecen las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sus métodos de análisis.
- [7] Consejo (2004). Reglamento (CE) 865/2004 de 29 de abril, Diario Oficial Legislación núm. 206 de 9 de junio, por el que se establece la organización común del mercado del aceite de oliva y de las aceitunas de mesa.
- [8] Madrid Vicente, A., Madrid Cenzano, J., coordinadores. *Legislación y normas sobre el aceite de oliva y las aceitunas de mesa*. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa; 2002.
- [9] Civantos, L., Contreras, R., Grana, R. *Obtención del aceite de oliva virgen*. Madrid: Editorial Agrícola Española, S. A.; 1992.
- [10] Civantos, L. *El olivo, el aceite, la aceituna*. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 1998.
- [11] Kiritsakis, A. K. *El aceite de oliva*. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones; 1992.
- [12] Sotiroudis, T. G., Kyrtopoulos, S. A. Anticarcinogenic compounds of olive oil and related biomarkers. *Eur. J. Nutr.* 2008; 47: 69-72.
- [13] Bester, D., Esterhuysen, A. J., Truter, E. J., van Rooyen, J. Cardiovascular effects of edible oils: a comparison between four popular edible oils. *Nutr. Res. Rev.* 2010; 23: 334-348.

- [14] Covas, M. I., Ruiz-Gutiérrez, V., de la Torre, R., Kafatos, A., Lamuela-Raventós, R. M., Osada, J., Owen, R. W., Visioli, F. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. *Nutr. Rev.* 2006; 64: 20-30.
- [15] Morales, M. T., Przybylski, R. "Oxidación del aceite de oliva". En: Aparicio, R., Harwood, J., editores. *Manual del aceite de oliva*. 1ª edición. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa; 2003, p. 443-473.
- [16] Norma COI/T.20/Doc. nº 4/Rev. 1 de 16 de noviembre de 2007 "Análisis sensorial: vocabulario general básico".
- [17] Norma COI/T.20/Doc. nº 5/Rev. 1 de 16 de noviembre de 2007 "Copa para la degustación de aceites".
- [18] Norma COI/T.20/Doc. nº 6/Rev. 1 de 16 de noviembre de 2007 "Guía para la instalación de una sala de cata".
- [19] Norma COI/T.20/Doc. nº 13/Rev. 1 de 16 de noviembre de 2007 "Metodología general para la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen".
- [20] Norma COI/T.20/Doc. nº 14/Rev. 2 de 16 de noviembre de 2007 "Guía para la selección, el entrenamiento y el control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen".
- [21] Norma COI/T.20/Doc. nº 15/Rev. 2 de 16 de noviembre de 2007 "Metodología general para la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen".
- [22] Alba, J., Izquierdo, J. R., Gutiérrez, F. *Aceite de oliva virgen. Análisis sensorial (la cata de aceite de oliva virgen)*. Madrid: Editorial Agrícola Española, S. A.; 1997.
- [23] Viola, P. *El aceite de oliva y la salud*. Madrid: Consejo Oleícola Internacional; 1997.
- [24] Morales, M. T., Tsimidou, M. El papel de los compuestos volátiles y los polifenoles en la calidad sensorial del aceite de oliva. En: Aparicio, R., Harwood, J., editores. *Manual del aceite de oliva*. 1ª edición. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa; 2003, p. 381-441.
- [25] Sánchez, J., Salas, J. J. Biogénesis del aroma del aceite de oliva. En: Aparicio, R., Harwood, J., editores. *Manual del aceite de oliva*. 1ª edición. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa; 2003, p. 89-107.
- [26] Morales, M. T., Alonso, M. V., Ríos, J. J., Aparicio, R. Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 2925-2931.

- [27] Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.* 2000; 68: 283-287.
- [28] Flath, R. A., Forrey, R. R., Guadagni, D. G. Aroma components of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 1973; 21: 948-952.
- [29] Lercker, G., Capella, P., Deserti, P. Volatile and aromatic compounds of extra virgin olive oils. *Sc. Techn. Alim.* 1973; 3: 299-303.
- [30] Reiners, J., Grosch, W. Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46: 2754-2763.
- [31] Aparicio, R. Caracterización del aceite de oliva: procedimientos matemáticos aplicables al análisis químico. En: Aparicio, R., Harwood, J., editores. *Manual del aceite de oliva*. 1ª edición. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa; 2003, p. 281-344
- [32] Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr., D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D. Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 8054-8062.
- [33] Guadarrama, A., Rodríguez-Méndez, M. L., Sanz, C., Ríos, J. L., de Saja, J. A. Electronic nose based on conducting polymers for the quality control of the olive oil aroma discrimination of quality, variety of olive and geographic origin. *Anal. Chim. Acta* 2001; 432: 283-292.
- [34] Ranall, A., Gomes, T., Delcuratolo, D., Contento, S., Lucera, L. Improving virgin olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 2597-2602.
- [35] Luaces, P., Sanz, C., Pérez, A. G. Thermal stability of lipoxygenase and hydroperoxide lyase from olive fruit and repercussion on olive oil aroma biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 6309-6313.
- [36] Padilla, M. N., Hernández, M. L., Pérez, A. G., Sanz, C., Martínez-Rivas, J. M. Isolation, expression, and characterization of a 13-hydroperoxide lyase gene from olive fruit related to the biosynthesis of the main virgin olive oil aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2010; 58: 5649-5657.
- [37] Morales, M. T., Ríos, J. J., Aparicio, R. Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 2666-2673.

- [38] Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S., López-Tamames, E. Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: modifications induced by oxidation and suitable markers of oxidative status. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 6564-6571.
- [39] Kanavouras, A., Hernández-Muñoz, P., Coutelieris, F., Selke, S. Oxidation-derived flavor compounds as quality indicators for packaged olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2004; 81: 251-257.
- [40] Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. Changes induced by UV radiation during virgin olive oil storage. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 4790-4794.
- [41] Di Giovacchio, L., Mucciarella, M. R., Costantini, N., Ferrante, M. L., Surricchio, G. Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002; 79: 339-344.
- [42] Bacchiocca, M., Biagiotti, E., Ninfali, P., Ambrogetti, M. Oxidation of extra virgin olive oils kept under controlled atmosphere. *Ind. Aliment.* 2001; 409: 1321-1325.
- [43] Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M. D., Fregapane, G., Lercker, G. Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: an overview. *Ital. J. Food Sci.* 2009; 21: 389-406.
- [44] Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M. D., Fregapane, G. Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chem.* 2007; 100: 36-42.
- [45] Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., Mestres, M. Evolution of Arbequina olive oil aroma and oxidation status over time under different atmospheres. *Food Control.* 2011 (enviado para su publicación).

*Evolution of Arbequina olive oil aroma and oxidation status  
over time under different atmospheres*

Artículo enviado para su publicación en la revista  
**Food Control (2011)**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## **Evolution of Arbequina Olive Oil Aroma and Oxidation Status over time under different Atmospheres**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres

Research Group of Analytical Chemistry of Wine and Food

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry

Campus Sescelades. Facultat d'Enologia de Tarragona

Universitat Rovira i Virgili. 43007 Tarragona (Spain)

### **ABSTRACT**

In this paper the natural evolution of Arbequina extra virgin olive oil during its usual maximum shelf-life (12 months) under three different atmospheres (air, nitrogen and argon) is reported. Considering the regulations of the European Commission, this evolution was assessed by the spectrophotometric absorbance at 232 nm and 270 nm, the peroxide values and the sensory analysis. To better understand the aromatic changes, we also evaluated the evolution of the virgin olive oil aromatic composition over time by gas chromatography-olfactometry (GCO). To get representative aroma extracts to be analysed by GCO, the solid-phase microextraction applied to the headspace of the sample (HS-SPME) was optimized. The results obtained showed that although the values of the parameters evaluated worsened over time whatever the atmosphere used, this evolution was slowed down when the extra virgin olive oil was bottled under a protective atmosphere. However, among the different parameters considered, the sensory analysis is much sensitive and able to detect oxidative deterioration at earlier stages than other parameters. Furthermore and the application of the GCO allowed correlating the evolution of the olive oil aroma with its chemical composition.

**Keywords:** Olive oil, aroma, evolution, oxidation, solid-phase microextraction (SPME), gas chromatography olfactometry (GCO)



## 1. INTRODUCTION

Since the first cultivation of olive trees in Crete during the Early Minoan times, about 3500 BC, olive oil has been an essential component of the diet in many Mediterranean civilizations (Mataix Verdú & Barbancho Cisneros, 2008; Riley, 2002).

Olive oil is obtained by grinding olives and extracting the liquid obtained by mechanical or chemical treatments, although only the first ones can be used when the aim is to obtain extra virgin or virgin olive oil. As they are the least processed forms of olive oil, these extra virgin and virgin olive oils have more monounsaturated fats, mainly oleic acid. The fatty acid profiles of these two types of oils, together with the presence of minor amounts of phenolic constituents, have demonstrated to provide great health benefits (Mataix Verdú *et al.*, 2008; Preedy & Watson, 2010). However, this monounsaturaton also promotes a shorter olive oil shelf life, as it is prone to become rancid from oxidation which will produce changes on its high nutritional value and organoleptic characteristics.

Taking into account the problem that poses olive oil oxidation, both the conditions preventing the spreading of this process and the presence of antioxidants play an important role on the preservation of olive oil quality. Thus, the effect of various compounds on virgin olive oil stability, such as tocopherols, carotenoids, chlorophylls, phenolic compounds or fatty acids, has been studied (Aparicio, Roda, Albi & Gutiérrez, 1999; Baldioli, Servili, Perretti & Montedoro, 1996; Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, Roca & Mínguez-Mosquera, 2005; Gutiérrez-Rosales, Garrido-Fernández, Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas & Mínguez-Mosquera, 1992; Inarejos-García, Santacatterina, Salvador, Fregapane & Gómez-Alonso, 2010; Morelló, Vuorela, Romero, Motilva & Heinonen, 2005; Okogeri & Tasioula-Margari, 2002; Papadopoulos & Boskou, 1991; Zunin, Leardi, Bisio, Boggia & Romusi, 2010), as well as the effect of different packaging variables, such as temperature, light or atmosphere among others (Caponio, Bilancia, Pasqualone, Sikorska & Gomes, 2005; Di Giovacchino, Mucciarella, Constantini, Ferrante & Surricchio, 2002; Gómez-Alonso, Mancebo-Campos, Salvador & Fregapane, 2007; Grigoriadou & Tsimidou, 2006; Guil-Guerrero, 2009; Gutiérrez & Fernández, 2002; Kanavouras & Coutelieris, 2006; Vekiri, Papadopoulou & Kiritsakis, 2007).

Although the great part of the studies about the virgin olive oil oxidation evaluates quality indexes, there are also several studies focused on the organoleptic changes because the deterioration of the characteristic sensorial properties implies a loss of quality. Therefore, to emulate this oxidation process and to determine the evolution of the olive oil aroma compounds, some techniques such as accelerated thermoxidation (Morales, Ríos & Aparicio, 1997) or UV radiation (Luna, Morales & Aparicio, 2006) have been applied. However, there is a significant gap in the literature regarding the natural evolution of virgin olive oil aroma over time (i.e. with not forced oxidation). Indeed, usually,

studies considering long periods of time only evaluate quality indexes such as acidity, peroxide value or extinction coefficients  $k_{232}$  and  $k_{270}$  (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005; Gómez-Alonso *et al.*, 2007; Guil-Guerrero, 2009) and, when considering the evolution of the volatile composition (Cavalli, Fernández, Lizzani-Cuvelier & Loiseau, 2004; Di Giovacchino *et al.*, 2002), the aroma has been evaluated as a whole with global scores (Di Giovacchino *et al.*, 2002).

The purpose of the present paper is to study the natural evolution of olive oil during its usual maximum shelf-life (12 months) under three different atmospheres: air, nitrogen and argon. Considering the European Union regulations (EC 2568/1991; EC 796/2002), this evolution was assessed by spectrophotometric absorbance at 232 nm, spectrophotometric absorbance at 270 nm, peroxide values and sensory analysis. To better understand the aromatic changes, we also determined the evolution of the virgin olive oil qualitative composition by obtaining representative aroma extracts with the Solid Phase Microextraction applied to the headspace of the sample (HS-SPME) and analysing them with gas chromatography olfactometry (GCO).

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Samples

The virgin olive oil used in this study belonged to the “extra virgin olive oil (EVOO)” class (according to the European Commission regulations) and was elaborated in an industrial oil mill from fresh and mature olives cv. Arbequina of good quality, produced in north-eastern part of Spain. The recently extracted EVOO was distributed in 45 different dark glass bottles: 15 of them were filled under nitrogen atmosphere, other 15 were filled under argon atmosphere and the last 15 were normally filled (i.e. without inert atmosphere). Samples were stored from January to December avoiding direct sunlight and considering a normal annual cycle of temperature in a market oil storage (which ranged from 30 °C in summer until 10 °C in winter). Three samples stored under each atmosphere were analysed right after packaging and also after 3, 6, 9 and 12 months in the bottle.

### 2.2. Reagents and Chemicals

The chemical standards of the aroma compounds were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and Lancaster (Bischheim, France) and their purity was above 90%. The other chemicals and reagents used were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). All of them were of analytical grade, except 2,2,4-trimethylpentane (iso-octane), that was of spectroscopy grade.

The synthetic sample used to evaluate the response (both SPME and sensory) over time was obtained by adding to a deodorized paraffin oil (used for a high vacuum pump) some different olive oil volatiles at the usual range of concentration of these compounds in real EVOO (Luna *et al.*, 2006; Reiners & Grosch, 1998; Ouni *et al.*, 2011; Tena, Lazzez, Aparicio-Ruiz & García-González, 2007): hexanal (2 mg Kg<sup>-1</sup>), (E)-2-hexenal (10 mg Kg<sup>-1</sup>), (E,E)-2,4-nonadienal (0.05 mg Kg<sup>-1</sup>), ethyl isobutyrate (0.05 mg Kg<sup>-1</sup>), 1-octen-3-one (0.01 mg Kg<sup>-1</sup>), acetic acid (10 mg Kg<sup>-1</sup>) and (Z)-3-hexenol (1 mg Kg<sup>-1</sup>).

### 2.3. Analytical determinations

To follow the EVOO evolution we determined the peroxide value (PV) and the UV specific extinction coefficients  $K_{232}$  and  $K_{270}$ . PV was obtained after treatment of the olive oil in acetic acid and chloroform by a solution of potassium iodide in the dark; the liberated iodine was then titrated with standardized sodium thiosulphate solution and the result was expressed as milliequivalents of active oxygen per kg of oil. The UV specific extinction coefficients were calculated from absorption of the olive oil dissolved in iso-octane at 232 nm and 270 nm. In all cases we followed the analytical methods described in the European Union Regulation (EC 2568/1991).

### 2.4. Sensory Analysis

The aroma evolution of the EVOOs packaged under the three different atmospheres was evaluated by a panel of 8 trained assessors. The descriptors employed were selected considering the indications specified in Annex XII of the European Union Regulation (EC 2568/1991) which sets the criteria required for organoleptic assessment of EVOO and also specify the specific vocabulary developed for this purpose. The assessors were firstly familiarized with these descriptors and trained by evaluating different olive oils at different degrees of oxidation. The training was carried out twice a week during five consecutively weeks, lasting each session 60 minutes. Then, they were asked to agree with the most representative descriptors for the positive and also for the negative attributes. The positive descriptors were: green, fruity, bitter and pungent. Regarding to the negative attributes, the assessors selected the following ones: musty, vinegary, metallic, rancid and greasy.

Related to the evaluation of the samples, assessors evaluated the odour of the different olive oils on a discontinuous scale for each descriptor from 0 (not detected) to 5 (maximum detection). The coefficients of variance of each single panellist for every sample replicates were less than 10%.

As it can be observed, the sensory analyses performed in this study differ from the ones carried out to get the grading of an olive oil. Indeed, although we chose some of the sensory descriptors recommend by the International Olive Oil Council (IOOC) and the European Union Regulations, the scale used is a different one as the purpose is not to classify olive oils but to follow the aroma evolution of an extra virgin olive oil under different atmospheres over time.

### **2.5. Sampling of volatiles by HS-SPME**

The volatile compounds of EVOOs were extracted and concentrated by using the solid-phase microextraction (SPME) applied to the headspace (HS) of the samples (HS-SPME) and employing the StableFlex Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) fibre with a film thickness of 50/30  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, PA) and 2 cm long. Thus, 5 g of sample were poured into a 20 ml glass vial with a little magnetic stir bar. After tightly capping the vial with a silicon septum, it was kept 30 min at 40  $^{\circ}\text{C}$  in a thermostatic bath. Then, the fibre was exposed to the headspace for 1 h. After extraction, it was removed from the vial and inserted into the split-splitless injection port of the GC for thermal desorption of the analytes at 270  $^{\circ}\text{C}$  for 1 minute in the splitless mode. All the fibres were conditioned before use and thermally cleaned between analyses by inserting them into the GC injection port at the temperature recommended by the supplier.

### **2.6. Gas Chromatography-Olfactometry (GCO)**

The olfactometric analyses were performed with a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID) and an olfactory detector. The split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min, using an inlet liner of 0.75  $\mu\text{m}$  i.d. to minimize peak broadening. The temperature of the FID was set at 250  $^{\circ}\text{C}$ . Chromatographic separations were performed using a Chrompack (Varian, Middelburg, The Netherlands) CP-Wax 57 CB (50 m x 0.25 mm i.d., 0.2  $\mu\text{m}$  film thickness) fused silica capillary column with helium as carrier gas at a constant flow-rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . The oven temperature program was: 40  $^{\circ}\text{C}$  (2 min), 6  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 225  $^{\circ}\text{C}$  (30 min). The column used to verify the identity of the compounds was a HP-5 MS (Agilent Technologies, USA) (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) fused silica capillary column with helium as carrier gas at a constant flow-rate of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . The oven temperature program was 40  $^{\circ}\text{C}$  (5 min), 2  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 120  $^{\circ}\text{C}$  and then 10  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  to 210  $^{\circ}\text{C}$  (30 min).

The olfactory detector employed to carry out the GCO analyses was commercialized by SGE International (Ringwood, Australia). This device has an outlet splitter system (ODO-I) that provides a variable range of split ratios by a micro control valve (OSS-2). The split ratio used in the olfactometric analysis was 1:10 into the FID and into the sniffing port, respectively, achieved by using two deactivated and uncoated fused silica capillaries (40 cm x 0.25 mm) as transfer lines between the valve and the detectors. The olfactory detector also incorporates a heated transfer section from the GC oven to the glass detection cone that maintains the unit at a temperature high enough to transfer the compounds to the detection cone without losses due to condensation. Moreover, the glass cone is purged with humidified air to prevent nasal mucous membranes from drying out over long periods of sniffing, which helps maintaining olfactory sensitivity.

Timing, intensity and description of aromas were recorded by three trained researchers replaced at 15 min intervals. Each sample was olfactometrically analysed six times using different fibres and in such way that every analyst sniffed all the chromatographic regions twice.

## 2.7. Compounds Identification

The odorants detected were identified by comparison with reference substances taking into account the odour quality perceived at the sniffing port, the retention index (RI) on the two stationary phases of different polarity above specified and the mass spectra obtained. To calculate the RI values, we added a series of n-alkanes (from 6 to 26 carbon atoms) to an EVOO sample which was extracted by SPME and analysed under the GC conditions aforementioned.

The mass spectra of the different odorants were obtained using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5973 quadrupole mass spectrometer. Mass spectra were recorded by electronic impact ionization at 70 eV. The interface, ion source and mass quadrupole temperatures were 200 °C, 230 °C and 150 °C respectively. The mass-to-charge (m/z) ratio range used was 35-300. The split-splitless injection port operated in the splitless mode at 270 °C for 1 min and chromatographic separation was carried out under the same conditions previously described for GCO.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

We chose the Spanish cultivar cv. Arbequina because, as reported in literature (Morales *et al.*, 1997), it is representative of a substantial proportion of the bottled olive oil traded in Europe. Moreover,

since this variety shows major quality changes thorough the storage than others usually cultivated in Spain such as Picual or Hojiblanca (Guil-Guerrero, 2009), it seemed to be more appropriate to better detect the possible changes produced during the storage period.

In addition, since light is one of the most important variables that influences on the EVOO oxidation (Guil-Guerrero, 2009; Gutiérrez et al., 2002; Velasco & Dobarganes, 2002), samples were stored in dark glass bottles. In that way, we avoided the main contribution to the oxidation of the samples during storage which could distort the evaluation of the effect of the different atmospheres.

### 3.1. Analytical Determinations

Figure 1 shows the evolution of the peroxide values (PVs) that, as can be seen, presented a different behaviour depending on the atmosphere considered. Thus, when the EVOO was stored under air, the PV significantly increased ( $\alpha < 0.05$ ) throughout the time studied, but mainly until the 9<sup>th</sup> month. The last stretch seemed to reach a decrease in oxygen availability which would avoid further peroxide production and, therefore, slow down the increase of the PV. However, when the EVOO was stored with an inert gas, it could be observed a significant increase ( $\alpha < 0.05$ ) on the PVs along the first trimester for both the argon (Ar) and the nitrogen (N<sub>2</sub>) samples but then, this parameter raised more slightly and its values were always significantly lower ( $\alpha < 0.05$ ) than those corresponding to the air. This behaviour could be attributed to the fact that the EVOO poured into the dark bottles under inert atmosphere contained oxygen dissolved which could have oxidized the oil at the beginning of the storage. On the other hand, when comparing the two inert gases evaluated, it can be stated that, although the PVs corresponding to the Ar atmosphere were always slightly lower than the ones obtained for the N<sub>2</sub> atmosphere, the differences between both gases were not significant ( $\alpha < 0.05$ ).

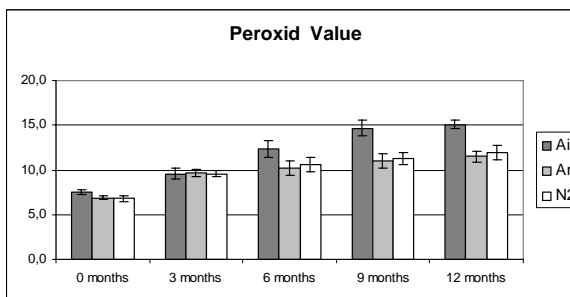
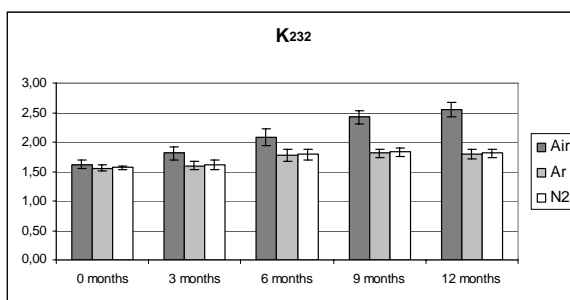


Figure 1. Evolution of the peroxide values over time and under the three different atmospheres studied

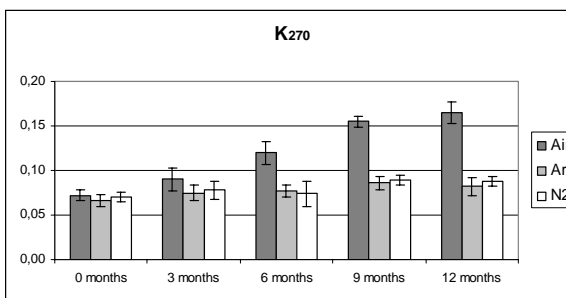
When evaluating  $K_{232}$  values, there was a correlation with peroxide values that agreed with other studies (Di Giovacchino *et al.*, 2002; Gómez-Alonso *et al.*, 2007; Grigoriadou *et al.*, 2006). The trend of  $k_{232}$  value is similar to that of PV as it also increased progressively when air was the atmosphere considered (**Figure 2**). Indeed, the sample without protective atmosphere slightly exceeded the maximum value allowed for an EVOO (2.5) after 12 months of storage. Therefore, since the  $k_{232}$  was the first index exceeding the upper limit established by the European Union regulation for EVOO, it could be a useful index to determine the commercial classification of olive oil. However, as occurred when dealing with PVs, the most important increment took place after 6-9 months of storage. This could be due to the fact that this period of time coincided with the warmer months and the higher temperatures could enhance this increment (Di Giovacchino *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002; Vichi, Pizzale, Conte, Buxaderas & López-Tamames., 2003a). Related to the presence of an inert gas, it could be checked that this fact helped to reduce the increase rate of the  $K_{232}$  and, although during the first months of storage we observed a slight increase of this parameter, after 3-6 months, this parameter nearly became constant. Thus, from the third month it could be observed that the highest  $K_{232}$  values corresponded to the EVOO stored under air and, from the sixth one, the values of this parameter coming from samples stored under inert atmosphere were significantly lower ( $\alpha < 0,05$ ) than the values coming from samples stored with air.



**Figure 2.** Evolution of the  $K_{232}$  values over time and under the three different atmospheres studied

Regarding  $K_{270}$  value changes during EVOO storage, these are graphically presented in **Figure 3**. In all cases,  $K_{270}$  values were under the limits established by the European Union regulations ( $K_{270} \leq 0,20$ ). As it can be seen, when the storage atmosphere was an inert gas, the slight increment of the  $K_{270}$  value observed was not significant for any period of time evaluated. However, when using air as storage atmosphere, the value of this parameter increased significantly over time except during the last trimester. Nevertheless, although some studies state that this variation during storage makes this parameter suitable for determining the time at which an EVOO will lose its “extra” category

(Gutiérrez *et al.*, 2002), in this study, and according to other researchers (Gómez-Alonso *et al.*, 2007; Guil-Guerrero, 2009), this behaviour was not observed. Moreover, these studies also conclude that low temperatures help the stability of this parameter. This temperature effect could be also observed in **Figure 3** where it is shown that the slighter increase of the  $K_{270}$  parameter occurred throughout the first and the last trimesters which corresponded to the cooler months (January-March) and (October-December).



**Figure 3.** Evolution of the  $K_{270}$  values over time and under the three different atmospheres studied

### 3.2. Sensory Analysis

The results obtained by the panel when evaluating the fresh packaged EVOO showed an olive oil aroma with clear grass, green, almond, artichoke and tomato connotations as well as notes of apple, ripe banana and green nut together with a slightly pungent sensation. These sensory characteristics are similar to the ones described in previous studies related to Arbequina variety (Luna *et al.*, 2006). As expected, the evaluation of the olive oils over time showed a decrease in the intensity of the positive attributes with the storage time whatever the atmosphere tested. However, the intensity of the negative ones, which showed very low values initially, did not display important variations except for the rancid and greasy attributes that showed an increase mainly when dealing without inert atmosphere. The results are showed graphically in the spider-web diagrams (**Figure 4**). Morales *et al.* (1997) found similar results when EVOO was subjected to a thermoxidation process since the initial flavour also disappeared in a few hours. The EVOO became then rancid and was described as “used oil”. However, in that case the oxidation was forced and prolonged for several hours, what resulted in unpleasant, rancid and penetrating aromatic notes that we did not find because our EVOO was only subjected to natural oxidation.



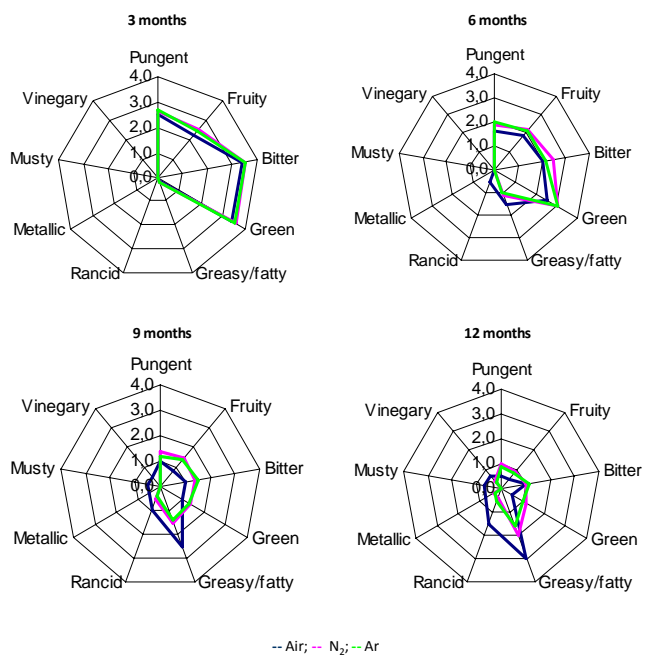


Figure 4. Evolution of the Aroma over time under the three different atmospheres studied

### 3.3. HS-SPME and GCO

#### 3.3.1. Optimization of HS-SPME sampling conditions

The different parameters that influence on the SPME process have been studied by evaluating not only the number of compounds extracted and their chromatographic response but also the number and intensity of the odorants detected. All the analyses were performed in triplicate and to avoid oxidation of the samples due to the handling, when we prepared the samples, we worked under N<sub>2</sub> atmosphere.

In previous studies several fibres were tested (Jiménez, Aguilera, Beltrán & Uceda, 2006; Vichi *et al.*, 2003b) and the Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) coating was found to be the most suitable for the analysis of virgin olive oils volatiles. We also corroborated this better behaviour as occurred when analysing other foods (Aceña, Vera, Guasch, Busto & Mestres., 2010; Martí, Mestres, Sala, Busto & Guasch, 2003).

To evaluate the influence of sample volume, 2.5 g, 5 g and 10 g were poured in a 20 mL vial. The results showed that, whereas 2.5 g of sample gave the highest variability on the response (RSD

between 10 and 20%) the amounts of 5 and 10 g provided responses no significantly different ( $\alpha < 0.05$ ). So, for practical reasons, the smallest amount of sample was chosen. Related to the time necessary to reach the equilibrium between the three phases (sample, headspace and fibre), it is well known that the extraction rate is strongly influenced by the temperature, so both parameters (time and temperature) were studied simultaneously. With this aim we designed a 2<sup>2</sup> factorial design plus an experiment in the centre of the domain which ranged from 30 °C to 50 °C for the temperature and from 30 min to 3 hours for the time. The different experiments were randomly performed and the optimal conditions corresponded to 2 hours at 40 °C. It has to be noted that shorter time (30 min) provided suitable chromatographic responses but lower number and intensity of odorants.

### 3.3.2. GCO

According to the UE and IOOC regulations, peroxide values,  $k_{232}$ ,  $k_{270}$  and sensory evaluation assess the oxidative deterioration of olive oil. There are some studies stating that the sensory evaluation detects oxidative deterioration before changes in the other parameters can be observed (Kalua *et al.*, 2007; Vichi *et al.*, 2003b). However, these studies only emphasise the importance of volatile compounds to detect the early stages of olive oil deterioration but they do not check the real impact of these volatiles on the sensory analysis changes. Indeed, some oxidation compounds such as nonanal or hexanal have been selected as markers of oxidative status of EVOO because of its high rate of formation but no sensory consideration has been taken into account (Kiritsakis, 1998; Morales *et al.*, 1997; Vichi *et al.*, 2003a).

Thus, to determine the compounds responsible for aroma changes, the aroma of the different EVOO samples was also extracted and analysed by GCO so the trained researchers provided the descriptor of each individual odour perceived together with its intensity. However, since the study was carried out over a year, one of the most important drawbacks was to ensure that the researchers would evaluate the samples considering a similar intensity scale over time. To get reliable results, in the present study we proposed the use of a synthetic sample which was analysed before each one of the quarterly GCO analysis sessions. This sample consisted on a paraffin oil which was spiked with different compounds at similar concentrations to those found in real EVOO, as explained in the chemical and reagents section. From the intensities perceived in the GCO effluent when analysing this sample, the three trained researchers refreshed the scale of intensities.

**Table 1** shows the odour-active compounds detected by GCO and their intensity evolution when analysing the olive oil stored under different atmospheres along different periods of time. As it can be observed, we found a similar behaviour for most of the compounds whatever the atmosphere used although it has to be noted that, when dealing with air, changes were usually more pronounced. A comparison with literature data is difficult because of the great variability of the volatile compositions, which depend on several parameters such as the ripeness stage of the olives when processed, the extraction technique followed or the analytical method employed (Cavalli *et al.*, 2004; Flamini, 2007; Vichi *et al.*, 2003a).

Among the different odour active compounds detected in the olive oil studied, aldehydes were the most abundant. In general, these compounds, and mainly the long chain aldehydes, are linked to an increase of its concentration and also of its aromatic perception due to the oxidation of the samples over time. However, although the amount of the saturated aldehydes suffered a greater increase during the oxidation process -mainly nonanal and hexanal as it has been previously described (Luna *et al.*, 2006; Morales *et al.*, 1997)- the unsaturated ones have, sometimes, a greater contribution to the overall aroma because of their much lower odour thresholds (Angerosa *et al.*, 2004). This fact can explain why, although octanal and nonanal gave chromatographic peaks in all the stages studied, their aromatic contribution was only detectable at an intermediate or advanced oxidation stage, when the chromatographic signal had increased three times. The odour threshold effect was also found when we considered the *Z* and *E* isomers of 2-nonenal. In this case, although both compounds showed an increase on its chromatographic peak along the time, the concentration of the *Z* isomer was almost 10 times lower than the concentration of the *E* isomer. However, in the GCO analysis, the intensity of the aroma perceived is very similar for both compounds and only for the *Z* isomer we detected an increase on its perception. This is due to the lower threshold value that shows the *Z* isomer (*Z* isomer:  $4.5 \mu\text{g kg}^{-1}$  and *E* isomer:  $900 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Kalua *et al.*, 2007; Reiners *et al.*, 1998)). Another very important aldehyde to be considered was (E)-2-hexenal. This compound, which presented very high intensities on the GCO analyses, dominates in the composition of the good quality European EVOOs (Flamini, 2007; Kalua *et al.*, 2004; Kirisakis, 1998). Its chromatographic peak showed a negative trend over time that was translated in a decreasing behaviour of its sensory evolution as occurs with (Z)-3-hexenal.

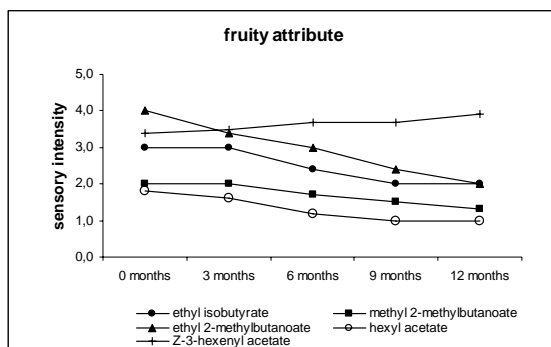
On the other hand, in a general way, oxidation promotes a content decrease of the different identified esters (Morales *et al.*, 1997) and, as shown in **Table 1**, this fact implied an intensity diminution of their individual perceptions. This common sensory reduction was perfectly correlated with the loss of the fruity character of the EVOO studied over time, since these compounds are usually related to this attribute. This behaviour, together with the one observed for the aldehydes,

coincides with Morales *et al.* (1997) findings that related the off-flavour of oxidized EVOOs to the absence of esters and the presence of many aldehydes with low odour thresholds. Nevertheless, we found some exceptions, such as the slight increase of intensity perception of (Z)-3-hexenyl acetate, which agreed with other studies where it was checked that some compounds, normally present in nonoxidized EVOO, were noted to increase their concentration when the oxidation was induced (Vichi *et al.*, 2003a).

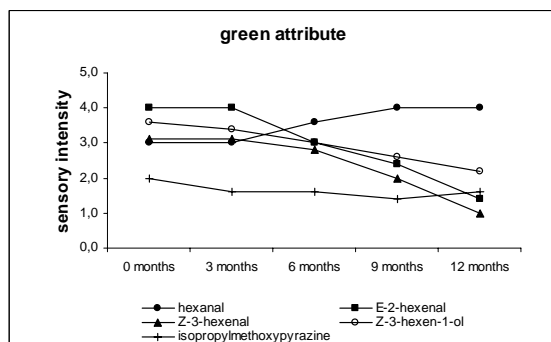
When considering the odour active acids, it is known that carboxylic acids higher than C3 are linked to oxidative rancidity and also to high oxidation degrees, as these compounds come from the aldehydes oxidation (Kalua *et al.*, 2007; Morales, Luna & Aparicio, 2005). However, since the olive oil here studied did not suffer from such strong oxidative process, the sensory perception of the acids detected was nearly constant.

On the other hand, according to Kalua *et al.* (2007), most of the smallest ketones, with five to seven carbon atoms, are linked to positive sensory characteristics. As it is specified in **Table 1**, both 1-penten-3-one and 1-hexen-3-one are perceived as pungent aromas which contribute to the positive pungent descriptor of olive oil. However, the contents and also the aromatic intensity of these compounds slowly decreased during the storage but their interaction with other compounds can be related to some defects. Thus, for example, (Z)-4-heptenal presents a synergic effect in presence of 1-penten-one that results on the development of a metallic defect.

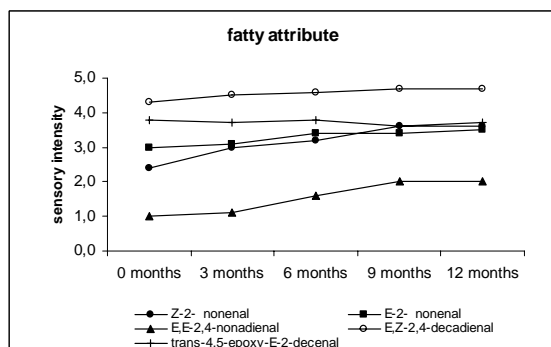
All these GCO results over time allowed an individual study of each odour that contributed to the overall aroma of the EVOOs studied. Thus, it could be checked that, in general, the individual behaviour of the aromatic compounds that are described by means of fruity notes or green notes presented a negative trend over time in a similar way as the global fruity note detected in the oils considered (**Figures 4, 5 and 6**). We could also see that the aromatic compounds described with the descriptor *fatty* showed an increase in their perception over time as happened when this attribute was overall considered in the olive oils analysed (**Figures 4 and 7**). Therefore, although the evolution of the sensory perception does not only depend on the odour of the single compounds but also on the interaction among the different aromatic compounds and also with other components of the sample matrix, we can conclude that the results obtained when analysing the aroma extracts with GCO allowed to correlate the sensory perception of the whole aroma with the aroma of each individual component of that whole aroma.



**Figure 5.** Evolution of the sensory intensity over time for the compounds related to the fruity note in EVOO bottled without protective atmosphere



**Figure 6.** Evolution of the sensory intensity over time for the compounds related to the green note in EVOO bottled without protective atmosphere



**Figure 7.** Evolution of the sensory intensity over time for the compounds related to the fat note in EVOO bottled without protective atmosphere

#### 4. CONCLUSIONS

From the results obtained we can conclude that, during storage, peroxide values and also  $K_{232}$  and  $K_{270}$  values strongly depend on the atmosphere olive oil was bottled with, in such a way that the values of these parameters were significantly lower when inert atmospheres were used. However, during the storage time studied (12 months), only the  $K_{232}$  value for EVOO bottled without an inert gas reached the upper limit which implies the loss of the “extra” quality for the oil. This is consistent with the results given by other authors, according to whom EVOO collected from the previous harvesting season and stored under nitrogen atmosphere did not show appreciable quality changes, in terms of quality indices.

On the contrary, a different behaviour was observed if the sensory evaluation was taking into account. When stored under an inert atmosphere, the olive oil could be considered EVOO during all the period of time studied. However, when storing EVOO together with air in the bottle, samples lost their “extra” quality only after 9 months of storage. This behaviour is due to the important loss of positive notes and the appearance of some negative attributes over time. Moreover, the GCO analyses which allowed the individual evaluation of the aromatic compounds showed a great correspondence with the global impression in such a way that the EVOO stored under an inert atmosphere showed a longer preservation of its sensory properties.

Therefore, these results corroborate the fact that the sensory analysis is much sensitive and able to detect oxidative deterioration at earlier stages than other chemical parameters.

#### Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (projects AGL2007-61550 and AGL2010-19688)



1455	1105	paprika	isopropylmethoxypyrazine	2.0	2.0	2.0	1.6	2.0	2.0	2.0	1.4	2.2	2.0	1.9	2.0	2.0
1460	b	acetic acid	acetic acid	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.2	3.6	4.0	4.0	3.0	3.6	3.4
1519	1155	fatty, green	(Z)-2-nonenal*	2.4	3.0	3.4	3.0	3.0	3.4	3.2	3.0	3.4	3.6	3.6	3.6	3.4
1535	1168	paperlike, fatty	(E)-2-nonenal	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.2	3.1	3.1	3.4	3.5	3.3	3.4
1625	824	cheese, vomit	butyric acid	2.4	2.0	2.0	2.4	2.4	1.9	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
1665	880	cheese	2/3-methylbutyric acid	4.5	4.5	4.0	4.5	4.6	4.1	4.4	4.6	4.4	4.5	4.6	4.4	4.4
1715	1220	fatty, grassy	(E,E)-2,4-nonadienal	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	1.6	1.2	1.1	2.0	2.0	1.6	1.4
1760	1301	metallic, rancid	(E,Z)-2,4-decadienal *	4.3	4.1	3.9	4.5	4.3	4.2	4.6	4.4	4.4	4.7	4.7	4.6	4.5
1815	1421	melmelada	$\beta$ -damascenone	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1865	1095	smoky	guaiacol	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.4	3.6	3.4	3.0	2.5	3.0	2.8
1932	1123	roses	2-phenyletanol	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	1.4	1.0	1.0	1.0
2031	1390	metallic, rancid	trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal *	3.8	3.9	3.8	3.9	4.0	4.0	3.8	3.8	3.8	3.6	3.5	3.5	3.5
2115	1481	sweet, lactone	$\gamma$ -decalactone	nd	nd	nd	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	nd	nd	nd	nd
2181	1172	animal	4-ethylphenol	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.4	1.8	1.6	1.0	1.0	1.0	1.0

RI: Retention index on different stationary phases

a: RI not calculated due to solvent interference

b: RI < RI of the first alkane (C6)

nd: not detected

\*: standard not commercially available



## REFERENCES

- Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O. & Mestres, M. (2010). Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: Application to roasted pistachio aroma. *Journal of Chromatography A*, 1217 (49), 7781-7787.
- Angerosa, F., Selvaggini, M.S.R., Taticchi, A.; Esposto, S. & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17-31.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A. & Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4150-4155.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G. & Montedoro, G.F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1589-1593.
- Caponio, F., Bilancia, M.T., Pasqualone, A., Sikorska, E. & Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology*, 221, 92-98.
- Cavalli, J.F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L. & Loiseau, A.M. (2004). Characterization of volatile compounds on French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry*, 88, 151-157.
- Di Giovacchino, L., Mucciarella, N., Constantini, N., Ferrante, M.L. & Surrlicchio, G. (2002) Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 339-344.
- European Union Commission. (1991). Regulation EC 2568/91. Official Journal of the European Communities.
- European Union Commission. (2002). Regulation EC 796/2002. Official Journal of the European Communities.
- Flamini, G. (2007). Headspace Analyses in valuable and functional foods: application of SPME in the quality control and characterization of olive oils. *Current Analytical Chemistry*, 3, 149-159.
- Frankel, E. N. (2010). Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5991-6006.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M. & Mínguez-Mosquera, M.I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of spanish virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82 (1), 33-39.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D. & Fregapane G. (2007). Evolution of major

- and minor components and oxidation indexes of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100, 36-42.
- Grigoriadou, D. & Tsimidou, M.Z. (2006). Quality control and storage studies of virgin olive oil: Exploiting UV spectrophotometry potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108 (1), 61-69.
- Guil-Guerrero, J.L. (2009). Efectos de algunas variables del envasado en la calidad de aceite de oliva virgen extra. *Grasas y Aceites*, 60 (2), 125-133.
- Gutiérrez-Rosales, F., Garrido-Fernandez, J., Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B. & Minguez-Mosquera, M.I. (1992). Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 866-871.
- Gutiérrez, F. & Fernández, J.L. (2002). Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of extra quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 571-577.
- Inarejos-García, A.M., Santacatterina, M., Salvador, M.D., Fregapane, G. & Gómez-Alonso, S. (2010). PDO virgin olive oil quality – Minor components and organoleptic evaluation. *Food Research International*, 43, 2138-2146.
- Jiménez, A., Aguilera, M.P., Beltrán, G. & Uceda, M. (2006). Application of solid-phase microextraction to virgin olive oil quality control. *Journal of Chromatography A*, 1121 (1), 140-144.
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood Jr D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D. & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100, 273-286.
- Kanavouras, A. & Coutelieris, F.A. (2006). Shelf-life predictions for packaged olive oil based on simulations. *Food Chemistry*, 96, 48-55.
- Kiritsakis, A.K. (1998). Flavor components of olive oil – A review. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 6, 673-681.
- Luna, G., Morales, M.T. & Aparicio, R. (2006). Changes induced by UV radiation during virgin olive oil storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13), 4790-4794.
- Martí, M.P., Mestres, M., Sala, C., Busto, O. & Guasch, J. (2003). Solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7861-7865.
- Mataix Verdú, J. & Barbancho Cisneros, F.J. (2008). *El aceite de oliva, alma del Mediterráneo*. (1st ed.). Jaén (Spain): Instituto de Estudios Giennenses - Diputación de Jaén. Universidad de Jaén - Servicio de Publicaciones (Chapter 4).

- Morales, M.T., Rios, J.J. & Aparicio, R. (1997). Changes in the volatile composition of Virgin Olive Oil during oxidation: Flavors and Off-Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2666-2673.
- Morales, M.T., Luna, G. & Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91, 293-301.
- Morelló, J.R., Vuorela, S., Romero, M.P., Motilva, M.J. & Heinonen, M. (2005). Antioxidant Activity of Olive Pulp and Olive Oil Phenolic Compounds of the Arbequina Cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 2002-2008.
- Okogeri, O. & Tasioula-Margari, M. (2002). Changes occurring in phenolic compounds and  $\alpha$ -tocopherol of virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1077-1080.
- Ouni, Y., Flamini, G., Issaouni, M., Nabil Ben, Y., Cioni, P.L., Hammami, M., Douja, D. & Zarrouk, M. (2011). Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chemistry*, 124 (4), 1770-1776.
- Papadopoulos, G. & Boskou, D. (1991). Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68 (9), 669-671.
- Preedy, V.R. & Watson, R.R. (2010). *Olives and olive oil in health and disease prevention*. (1st ed.). London, Burlington, San Diego: Academic Press. Elsevier, (Section 2).
- Reiners, J. & Grosch, W. (1998). Odorants of Virgin Olive Oils with Different Flavor Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (7), 2754-2763.
- Riley, F.R. (2002). Olive Oil Production on Bronze Age Crete: Nutritional properties, Processing methods, and Storage life of Minoan olive oil. *Oxford Journal of Archaeology*, 21 (1), 63-75.
- Tena, N., Lazzez, A., Aparicio-Ruiz, R. & García-González, D.L. (2007). Volatile compounds characterizing Tunisian Chemlali and Chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (19), 7852-7858.
- Vekiari, S.A., Papadopoulou, P. & Kiritsakis, A. (2007). Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes. *Grasas y Aceites*, 58, 237-242.
- Velasco, J. & Dobarganes, C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science Technology*, 104, 661-676.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S. & López-Tamames, E. (2003a). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (22), 6564-6571.
- Vichi, S., Castellote, A.I., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S. & López-Tamames, E. (2003 b). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas

chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983, 9-33.

Zunin, P., Leardi, R., Bisio, A., Boggia, R. & Romussi, G. (2010). Oxidative stability of virgin olive oil enriched with carnosic acid. *Food Research International*, 43, 1511-1516.

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## **CONCLUSIONES**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

Como ya se ha comentado en los objetivos de esta tesis doctoral, y se ha constatado a lo largo de esta memoria, el aroma de los alimentos está íntimamente relacionado con la calidad y su análisis constituye uno de los mayores retos para quienes trabajan en el mundo de los aromas. No sólo por la gran cantidad de compuestos volátiles implicados, cada uno con una cualidad aromática y unas propiedades químicas diferentes, sino también por el amplio rango de concentraciones en las que estos odorantes aparecen, a lo que hay que añadir las dificultades que introduce la propia naturaleza de las matrices alimentarias.

Por este motivo, los trabajos desarrollados y aquí presentados pretenden contribuir de algún modo al avance en este campo de investigación. Además de haberse estudiado la idoneidad de dos técnicas distintas para extraer los compuestos volátiles de los alimentos, también se ha aplicado la cromatografía de gases-olfatometría para caracterizar los odorantes responsables del aroma de ciertos productos típicos de la dieta mediterránea, así como para evaluar la evolución en el tiempo de su calidad sensorial.

A continuación se exponen las conclusiones que se han obtenido, fruto del trabajo experimental llevado a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

## **EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS**

- 1.- Las dos técnicas de extracción y concentración empleadas, la microextracción en fase sólida sobre el espacio de cabeza (HS-SPME) y la extracción directa con disolventes (DSE) seguida de *high-vacuum transfer* (HVT), han demostrado ser válidas para la obtención de extractos aromáticos representativos.
- 2.- Una vez optimizadas y comparadas las dos técnicas en términos de repetitividad y reproducibilidad, se ha comprobado que ambas permiten llevar a cabo métodos de análisis precisos, con coeficientes de variación de la repetitividad (2,9% para



SPME y 5,1% para DSE) y de la reproducibilidad (5,2% para SPME y 8,2% para DSE) adecuados. Sin embargo, y a pesar de los buenos resultados de la DSE-HVT, la HS-SPME ha demostrado ser una técnica más precisa, al proporcionar valores de coeficientes de variación considerablemente menores.

- 3.- De entre las distintas fibras de SPME utilizadas, se ha comprobado que las recubiertas por una fase estacionaria de Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) son las más eficaces, ya que permiten extraer un mayor número de compuestos aromáticos. Y este hecho se ha confirmado tanto para la extracción de matrices alimentarias líquidas como sólidas.
- 4.- Se ha constatado la necesidad de trabajar con matrices sintéticas semejantes a aquéllas que se están analizando. De otro modo, la extracción de los distintos odorantes para llevar a cabo los estudios de cuantificación o la evaluación de las propiedades sensoriales no se hace en condiciones que permitan extrapolar los resultados obtenidos.

## **CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA**

- 1.- Tanto la HS-SPME como la DSE-HVT permiten obtener extractos aromáticos aptos para el análisis mediante la GCO. Sin embargo, la SPME constituye una técnica mucho más rápida y sencilla, que apenas precisa manipulación de la muestra. Debido a que no requiere disolventes, proporciona extractos mucho más limpios, sin olores ajenos al producto que se analiza o a artefactos generados durante la extracción, con lo que no hay interferencias en la detección de los aromas.
- 2.- Las dos variantes de la técnica de dilución AEDA empleadas con la SPME han resultado válidas para establecer una jerarquización de los compuestos aromáticos de los distintos alimentos analizados en función de su potencia aromática.

- 3.- En el caso del análisis del aroma del vinagre de vino con DOP “Vinagre de Jerez” se ha comprobado que el método de pretratamiento de las muestras desarrollado para el análisis olfatométrico puede utilizarse con fines cuantitativos, a pesar de la diversidad química de los odorantes implicados y del amplio abanico de concentraciones en las que estos aparecen.
- 4.- Asimismo, se ha verificado que la GCO es una técnica indispensable para la caracterización del aroma de los alimentos, la única que permite detectar de forma individual aquellos compuestos que realmente contribuyen al aroma. De este modo se han podido identificar por vez primera 13 potentes odorantes en las distintas muestras de vinagre de Jerez estudiadas: la 3-isopropil-2-metoxipirazina, la 3-isobutil-2-metoxipirazina, el trisulfuro de dimetilo, el metanotiol, la  $\beta$ -damascenona, el (E,E)-2,4-decadienal, el trans-cinamato de etilo, el (E)-2-nonenal, la 1-octen-3-ona, el nonanal, el octanal, el 3-metilbutanal y el 2-metilbutanal. Debido a las bajas concentraciones en las que aparecen o al solapamiento con otros picos cromatográficos, todos estos compuestos habían sido ignorados hasta la fecha por las investigaciones en las que no se empleaba la detección olfatométrica.
- 5.- Del mismo modo, la GCO ha permitido caracterizar por primera vez el perfil aromático de dos variedades distintas de pistachos tostados y, además, ha confirmado los datos obtenidos a partir del análisis sensorial de las muestras: la variedad con una mejor evaluación sensorial global ha demostrado ser la que presenta un mayor número de regiones odoríferas, detectables por GCO hasta factores de dilución más altos.
- 6.- Respecto al aceite de oliva virgen extra, la GCO ha demostrado ser una técnica válida para evaluar la calidad sensorial de este alimento a lo largo del tiempo, ya que es capaz de permitir la detección de algunas anomalías organolépticas antes que ciertos parámetros químicos tradicionalmente empleados con este fin.

## LÍNEAS DE FUTURO

- Aplicar la técnica de la GCO en el estudio de los compuestos aromáticos de dos de las familias de frutos secos cuyo aroma aún no ha sido analizado, los piñones y las nueces de macadamia, para completar la información acerca de los odorantes responsables del aroma de este tipo de alimentos, típicos de la dieta mediterránea.
- Aplicar la técnica de la GCO en el estudio el perfil aromático de las distintas variedades de pistachos ya analizados, pero antes de ser sometidos al tostado. Así se podrá completar la investigación iniciada identificando los odorantes que provienen de la materia prima y los que se generan gracias al proceso de elaboración.
- Profundizar en la idoneidad de la GCO como técnica capaz de evaluar la calidad organoléptica de los productos alimentarios a lo largo de toda su vida útil. De este modo se podrá estudiar su uso como técnica complementaria a otros parámetros químicos usualmente empleados, pero que no responden directamente de las propiedades sensoriales de los alimentos, que son, al fin y al cabo, las percibidas por los consumidores.

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

**CONTRIBUCIONES  
CIENTÍFICAS**

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA

Laura Aceña Muñoz

ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011

## ARTÍCULOS

Laura Aceña, Olga Busto, Montserrat Mestres, Josep Guasch. *La cromatografía de gases con detector olfatimétrico: una herramienta esencial para el análisis del aroma de bebidas alcohólicas*. **Cerveza y Malta XLVI (2), 2009, 182, 49-62.**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres. *Comparative study of two extraction techniques to obtain representative aroma extracts for being analysed by gas chromatography-olfactometry: application to roasted pistachio aroma*. **Journal of Chromatography A 1217 (2010) 7781-7787.**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres. *Determination of roasted pistachios (*Pistacia vera* L.) key odorants by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011, DOI: 10.1021/jf104496u.**

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres. *Chemical characterization of commercial Sherry vinegar aroma by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011** (enviado para su publicación).

Laura Aceña, Luciano Vera, Josep Guasch, Olga Busto, Montserrat Mestres. *Evolution of Arbequina olive oil aroma and oxidation status over time under different atmospheres*. **Food Control 2011** (enviado para su publicación).

## **PARTICIPACIONES EN CONGRESOS**

### **VI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines.**

Vigo, 8 a 10 de noviembre de 2006.

*Determination of odorants of wine vinegar using solid-phase microextraction and gas chromatography olfactometry* (Póster).

**IX Congreso Nacional de Investigación Enológica.** Badajoz, 29 de mayo a 1 de junio de 2007.

*Estudio olfatimétrico del aroma del vinagre* (Póster).

Laura Aceña, M. Pilar Martí, Montserrat Mestres, Josep Guasch. *Estudio olfatimétrico del aroma del vinagre*. En: Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector Vitivinícola. Badajoz: Junta de Extremadura. Consejería de Economía y Trabajo; 2007, p. 375-377. I.S.B.N.: 978-84-690-6060-5 (Capítulo de libro).

**XIV Congreso Nacional de Enólogos.** San Lorenzo de El Escorial, 12 a 14 de junio de 2008.

*Estudio olfatimétrico del aroma del vinagra con D.O. "Vinagre de Jerez"* (Póster).

**X Congreso Nacional de Investigación Enológica.** Ourense, 3 a 5 de junio de 2009.

*Análisis de los odorantes del vinagre con D.O. "Vinagre de Jerez"* (Póster).

Laura Aceña, Montserrat Mestres, Olga Busto, Josep Guasch. *Análisis de los odorantes del vinagre con D.O. "Vinagre de Jerez" mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases-olfatometría*. En: Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología. Vigo: Servizo de Publicacións Campus das Lagoas-Marcosende; 2009, p. 689-692. I.S.B.N.: 978-84-8158-438-7 (Capítulo de libro).

APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011



APLICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA EN LA CARACTERIZACIÓN  
DEL AROMA DEL VINAGRE DE VINO, DE LOS PISTACHOS Y DEL ACEITE DE OLIVA  
Laura Aceña Muñoz  
ISBN:9788469432341/DL:T. 1040-2011