



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo de Fin de Grado

Aplicación de FPSE a la extracción de compuestos volátiles en fase gas desprendidos de envases alimentarios multicapa con cierre termosellado y análisis por APGC-MS

Celso Segura Sánchez

Directores

Margarita Aznar Ramos

Celia Domeño Recalde

Facultad de veterinaria

2015

---

## ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	6
3. Material y métodos.....	12
3.1. Reactivos y muestras.....	12
3.1.1. Patrones y disoluciones.....	12
3.1.2. Telas FPSE.....	12
3.1.3. Muestras.....	13
3.1.4. Preparación de las disoluciones.....	13
3.1.4.1. Preparación de la disolución madre de 200 ppm.....	13
3.1.4.2. Preparación de la disolución conjunta de 20ppm.....	14
3.2. Análisis por GC-MS.....	15
3.2.1. Equipo.....	15
3.2.2. Condiciones de análisis: de la cromatografía de gases y de la detección por MS.....	15
3.2.2.1. Condiciones cromatográficas.....	15
3.2.2.2. Detección MS en modo SCAN.....	15
3.2.2.3. Detección MS en modo SIM.....	15
3.3. Extracción por FPSE.....	17
3.3.1. Protocolo general de extracción FPSE.....	17
3.3.2. Optimización de la extracción.....	18
3.3.2.1. Optimización de la etapa extracción de los tejidos FPSE.....	18
3.3.2.2. Optimización de la etapa de retención de los analitos en el tejido FPSE.....	18
3.3.2.3. Optimización de la etapa de agitación.....	19
3.3.2.4. Optimización de la etapa de limpieza.....	19
3.3.3. Protocolo final de extracción.....	19
3.3.4. Comparación de la extracción de los compuestos en las diferentes telas.....	20
3.3.5. Adición de NaCl al 10% para mejorar la extracción.....	20
3.4. Análisis de muestras.....	20

4. Resultados y conclusiones.....	21
4.1. Rectas de calibración y parámetros analíticos.....	21
4.1.1. Ecuaciones de la recta, límites de detección y límites de cuantificación.....	21
4.1.2. Cromatograma SIM.....	22
4.1.3. Figuras de las rectas de calibrado de cada compuesto.....	22
4.2. Optimización de la extracción con FPSE.....	23
4.2.1. Optimización de la back-extraction.....	23
4.2.2. Optimización de la extracción.....	24
4.2.3. Extracción de los compuestos en las diferentes telas.....	27
4.2.4. Adición de NaCl al 10% para mejorar la extracción.....	29
4.3. Evaluación del método.....	30
4.4. Análisis de compuestos volátiles en aguas de sabores.....	31
4.4.1. Tabla de compuestos detectados en limón y naranja.....	31
4.4.2. Cromatograma de la muestra de limón concentrada.....	32
5. Conclusiones.....	33
6. Valoración personal.....	35
Bibliografía.....	36
ANEXO I.....	37
Apéndice I.....	37
Apéndice II.....	41
Apéndice III.....	42

## 1. RESUMEN

Se ha desarrollado recientemente una nueva metodología de extracción denominada FPSE (fabric phase sorptive extraction basada en la sorción de compuestos en tejidos inicialmente recubiertos con polímeros de diferente naturaleza físico-química. La unión del sustrato (tejido) y los sorbentes se lleva a cabo mediante la tecnología sol-gel, que permite enlaces químicos y por tanto una gran estabilidad en la unión. Los extractos obtenidos mediante FPSE pueden analizarse tanto en cromatografía de líquidos como de gases.

El objetivo del trabajo ha sido optimizar un método de análisis mediante FPSE para la extracción y posterior análisis de compuestos volátiles en matrices acuosas y aplicarlo posteriormente al análisis de compuestos responsables del aroma en bebidas. Se han seleccionado para ello tres tipos de tejidos FPSE con diferentes polaridades: uno polar (PEG), uno de polaridad media (PTHF) y uno más apolar (PDMS). Para la optimización, se estudió el efecto de la extracción de una serie de factores, tales como el disolvente de extracción, el volumen de muestra, el tiempo de agitación o la adición de NaCl.

Se seleccionaron para el estudio trece compuestos de distintas masas, estructuras, grupos funcionales y polaridades. Debido a la naturaleza volátil de los compuestos seleccionados, los análisis de los extractos se realizaron por cromatografía de gases y la detección por espectrometría de masas, mediante el cálculo de los factores de concentración para cada compuesto. Los resultados fueron muy positivos, llegando a detectar concentraciones de 200 hasta 50ppb.

Por último, se aplicó el procedimiento diseñado al análisis de compuestos volátiles en aguas de refresco aromatizadas con limón y naranja, para observar la eficacia del método en un alimento. Los resultados obtenidos fueron positivos, detectando más de 10 compuestos volátiles responsables del aroma. De los compuestos seleccionados para la optimización sólo el limoneno fue detectado pero por debajo de los límites de cuantificación.

## Summary

Recently, a new extraction methodology called FPSE (fabric phase sorptive extraction) has been developed. This technique is based on the adsorption of compounds onto fabrics that have been previously coated with polymers of different physicochemical properties. The substrate (fabric) and the sorbents are bound using the sol-gel technology, which allows the formation of chemical bounds and therefore creates a very stable product. The extracts obtained by FPSE can be analysed by both liquid and gas chromatography.

The objective of this work was to optimize an analysis method by FPSE to extract and further analyse volatile compounds in aqueous mixtures. This would be later applied to analyse the compounds responsible for the aroma in beverages. For this purpose, three types of fabrics with different polarities were selected: a polar fabric (PEG), a material with lower polarity (PTHF) and a more apolar fabric (PDMS). During optimization, the effect of various factors of the extraction was studied, such as the extraction solvent, the sample volume, the agitation time and the addition of NaCl.

Thirteen compounds, with different mass, structure, functional groups and polarity, were selected for the study. Due to the volatile nature of these compounds, the analysis was performed using gas chromatography and the detection was done by mass spectrometry and was calculated using the concentration factor for each compound. The results were very satisfactory, being able to detect concentrations of 200 to 50ppb. Lastly, to observe the efficiency of this method in a food product the optimized procedure was applied to the analysis of volatile compounds in beverages aromatized with lemon and orange flavours. Positive results were obtained, detecting more than 10 volatile compounds responsible for the aroma. Of the compounds selected for optimization, only the limonene was detected, although below quantification levels.

## 2. INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha diseñado una nueva metodología de extracción basada en la sorción en tejidos previamente recubiertos con polímeros de diferente naturaleza físico-química. La unión del sustrato y los sorbentes se lleva a cabo mediante la tecnología sol-gel, que permite enlaces químicos y por tanto una gran estabilidad en la unión. Esta metodología de extracción, denominada FPSE (fabric phase sorptive extraction), se ha aplicado con éxito al análisis de compuestos no volátiles en matrices líquidas, como el análisis de residuos antibióticos en leche o de estrógenos en orina (Kumar, 2014).

Anteriormente se ha trabajado en el grupo GUIA en la optimización de esta metodología para el análisis de antioxidantes, captadores UV y otros compuestos no volátiles en matrices líquidas obteniendo resultados satisfactorios. Los resultados mostraron que la cantidad de compuestos extraída dependía de diferentes factores, entre ellos, la similitud de polaridades entre la tela y el analito extraído. En este trabajo se ha planteado el uso de la FPSE para la extracción de compuestos volátiles en matrices acuosas y su posterior análisis por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas (GC-MS).

La extracción FPSE (fabric phase sorptive extraction) es un método reciente que ha integrado con éxito las ventajas de la tecnología sol-gel, la microextracción en sorbentes y el uso de tejidos de celulosa como sustratos, resultando ser un medio de preparación de muestra altamente sensible y eficiente. En la extracción FPSE los analitos son retenidos en tejidos previamente recubiertos con un sorbente mediante la tecnología sol-gel. Para ello, la disolución donde se encuentran presentes los analitos se pone en contacto con un tejido FPSE en agitación constante. Posteriormente, el tejido es extraído con un pequeño volumen de solvente orgánico que se inyectará en el equipo de análisis. La figura muestra un esquema de la extracción FPSE (Ilustración 1). Esta técnica innovadora ha abordado dos deficiencias principales sobre técnicas anteriores: la baja capacidad de muestra y el alto tiempo de preparación de muestra. La combinación de una superficie de celulosa intrínsecamente porosa como sustrato, y la robustez de la tecnología sol-gel para la unión del sustrato (tejido) y los sorbentes, ha permitido la utilización de grandes cantidades sorbentes de extracción dispersos como una película absorbente ultra fina en la matriz de sustrato de celulosa, produciendo un fenomenal aumento en la capacidad de retención del analito, con un equilibrio de extracción muy rápido (Kumar, 2014). Las ventajas de utilizar este método son múltiples:

- **Flexibilidad de sustrato:** permite torsión, flexión y compresión de los medios de extracción y por lo tanto es compatible con cualquier tipo de recipiente de muestreo.
- **Contacto directo con el área de superficie (PCSA):** la gran superficie de contacto permite la interacción inmediata analito y el absorbente asegurando el equilibrio de extracción rápida y analitos diana altamente preconcentrados.
- **Elución de disolvente / Back-extracción:** debido a la fuerte unión del enlace covalente no hay ninguna restricción en la selección del disolvente de elución.
- **Volumen de disolvente back-extracción:** requiere una pequeña cantidad de disolvente back-extracción ( $\leq 500\mu\text{l}$ ). No es necesario la evaporación del disolvente ni la reconstrucción del analito.
- **Selección sorbente:** amplia variedad de absorbentes disponibles
- **Estabilidad del pH:** gran estabilidad de pH entre 1-13.
- **Reciclaje de las telas:** una vez usadas, se pueden volver a utilizar como nuevas si se aplica una limpieza correcta.
- **Sensibilidad de extracción:** Capaz de extraer analitos en concentraciones a nivel de ppm/ppb en la matriz de la muestra.
- **Reproducibilidad:** proceso de recubrimiento sol-gel (a través de reacciones químicas) asegura reproducibilidad de recubrimiento lote a lote sin precedentes.
- Cientos de **revestimientos sol-gel** se pueden utilizar como sorbente y con un gran número de sustratos potenciales.



Ilustración 1. Esquema de extracción por FPSE (Aznar et al, 2015).

El objetivo final del trabajo es poder utilizar esta técnica para la extracción y posterior análisis de compuestos volátiles responsables del aroma en bebidas. Se seleccionaron para ellos tres tipos de telas con diferentes polaridades: una tela polar (PEG), una de polaridad media (PTHF) y una más apolar (PDMS) (Aznar et al, 2015). Para la selección de los compuestos volátiles se tuvieron en cuenta diferentes parámetros físico-químicos, de forma que se consiguiera un set de compuestos representativo. Los compuestos seleccionados tenían a su vez diferentes aromas y habían sido detectados en alimentos

El aroma global de un alimento es el resultado de la presencia de compuestos volátiles que se perciben por el estímulo de receptores olfativos localizados en la cavidad nasal. El impacto de los compuestos volátiles en el aroma de un determinado alimento viene expresado por su valor aromático definido como la relación en la concentración del componente volátil en el alimento frente al umbral de reconocimiento de dicho componente. Los compuestos volátiles responsables del aroma de los alimentos pueden ser de naturaleza química distinta, encontrándose entre ellos, compuestos como grupos cetona (1-octen3-ona), aldehído (diacetilo, octanal), alcohol (cis-3-hexenol, furfuryl alcohol, eugenol), ésteres (butirato de etilo, isovalerato de etilo, octanoato de etilo), terpenos (limoneno, linalool) o ácidos (ácido butírico), además de otros grupos como hidrocarburos o lactonas (Rodríguez Rivera & Simón Magro, 2008).

El diacetilo (butano-2,3-diona) es un aldehído que está involucrado en diversas reacciones de diferentes alimentos. Es responsable de la intensificación del olor y aroma en productos lácteos como la mantequilla (Ramirez Ramirez, 2011). El butirato o el isovalerato de etilo son unos componentes volátiles típicos de los vinos proporcionando aromas afrutados como el del arándano (Raynal, y otros, 2010). Otros compuestos como el limoneno pueden ser aceites esenciales con un efecto antimicrobiano en los alimentos frente al *S. aureus* (Cruz, Donaldo, Marquez , & Cardona, 2014).

Tabla 1. Compuestos volátiles aromáticos presentes de forma natural en alimentos no fermentados ni tratados térmicamente (frutas, verduras, hortalizas, plantas aromáticas y especias).

Fuente: (Rodríguez Rivera & Simón Magro, 2008)

Tipos de compuestos	Reacciones enzimáticas implicadas en su producción	Sensaciones olfativas de algunos compuestos
Carbonilos	$\alpha$ -oxidación de ácidos grasos Desaminación oxidativa de aminoácidos Descarboxilación de $\alpha$ -cetoácidos	2-hexenal (afrutado) 3-metilbutanal (afrutado, malta) acetaldehído (afrutado, hierba) 2,6-nonadienal (pepino) 1-octen-3-ona (champiñón) benzaldehído (almendra) fenilacetaldehído (floral)
Alcoholes	Reducción de aldehídos via alcoholdehidrogenasas	1-octen-3-ol (champiñón) feniletanol (floral) 3-hexenol (hierba fresca)
Alcoholes aromáticos	Ruta biosintética del ácido shiquímico	vainilina (vainilla) eugenol (clavo)
Ésteres	Metabolismo del acetyl-CoA	etil butanoato (piña, manzana) etil hexanoato (plátano, piña) 3-metil butilacetato (plátano) metil 2-metilbutanoato (manzana)
Hidrocarburos	$\beta$ -oxidación de ácidos grasos insaturados	1,3,5-undecatrieno (especiado) 1,3,5,8-undecatetraeno (piña)
Lactonas	$\beta$ -oxidación de hidroxiaácidos grasos obtenidos a partir de ácidos insaturados	$\gamma$ -hexalactona (dulce, caramelo) $\gamma$ -octalactona (coco) $\delta$ -decalactona (melocotón)
Terpenos	Biosíntesis por la ruta isoprenoide	citral (cítrico) $\alpha$ -pineno (pino) linalool (floral) mentona (menta) geraniol (rosa)
Compuestos azufrados	Metabolismo de aminoácidos azufrados Adición de sulfuro de hidrógeno en el metabolismo isoprenoide	2-isobutiltiazol (tomate) tiosulfinato de dialilo (ajo) 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (pomelo)
Pirazinas	Biosíntesis de la leucina	2-metoxi-3-isopropilpirazina (patata) 2-metoxi-3-isobutylpirazina (pimiento)

El octanal puede aparecer como fracción volátil del jamón curado en la degradación lipídica (Gianelli Barra, 2005) y la 1-octen-3-ona, que también aparece como compuesto volátil en este tipo de alimento, puede aparecer en la parte de las grasas (Jurado, García, Timón, & Carrapiso, 2009).

Respecto a otros compuestos, el octanoato de etilo es un compuesto muy común en los vinos, dando unos tonos afrutados y frescos (Cacho Palomar, 2006). El eugenol se extrae del clavo, y es a su vez un compuesto común en vinos crianza (González Escobar, 2002).

Debido a la naturaleza de los compuestos elegidos para la extracción FPSE, la técnica seleccionada para su análisis fue la cromatografía gas con detección por espectrometría de masas (GC-MS). La cromatografía es esencialmente un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (lecho estacionario), y otra móvil (fase móvil), la cual pasa a través de la primera. Este proceso se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma.

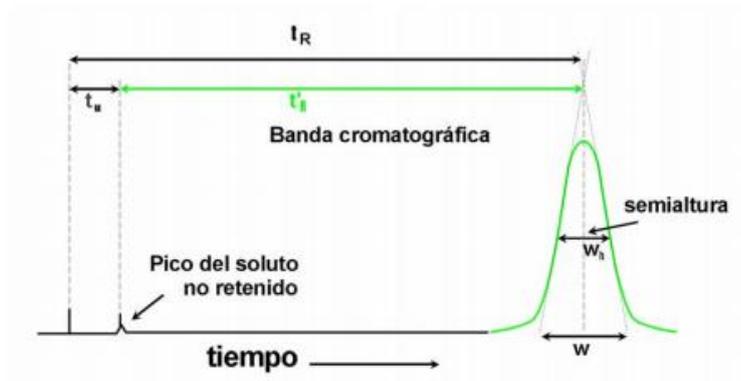


Ilustración 2. Cromatograma de un componente y sus parámetros característicos (CSIC, 2015)

En este caso se utiliza la cromatografía de gases cuyos componentes fundamentales son: fuente de gas, sistema de inyección, horno y columna cromatográfica, sistema de detección y sistema de registro (CSIC, 2015).

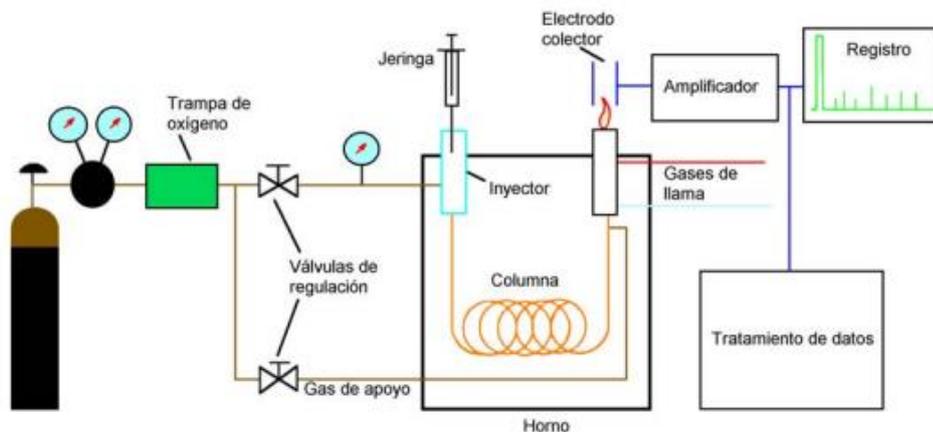


Ilustración 3. Esquema de un cromatógrafo de gases (CSIC, 2015).

Los dispositivos de inyección de muestras tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo los siguientes requisitos: vaporización lo más rápido posible, realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra, y la muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.

La columna utilizada puede tener diferentes polaridades y se seleccionará en función de los compuestos que vayan a ser analizados. Otros parámetros importantes de la columna son su longitud, el espesor de fase y el diámetro interno.

El sistema de detección utilizado fue la espectrometría de masas, que permite una alta sensibilidad y selectividad en la detección. La ionización se llevó a cabo mediante impacto electrónico, en el que un haz de electrones (70 eV) impacta con las moléculas en fase gas ionizándolas. El exceso de energía en las moléculas hace que se produzca una fragmentación de las mismas, los fragmentos producidos son muy útiles para determinar la estructura de la molécula (Corral Payá, 2006).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. REACTIVOS Y MUESTRAS

##### 3.1.1. Patrones y disoluciones

Tabla 2. Compuestos, N° CAS, peso molecular y log P.

Compuestos	N° CAS	Peso molecular (g/mol)	Log P
<i>Diacetilo</i>	431-03-8	86,48	-0,348
<i>Butirato de etilo</i>	105-54-4	130,78	1,443
<i>Isovalerato de etilo</i>	108-64-5	145,97	1,801
<i>Limoneno</i>	138-86-3	169,17	3,604
<i>Octanal</i>	124-13-0	157,36	2,856
<i>1Octen3ona</i>	4312-99-6	152,30	2,434
<i>3Cishexen1ol</i>	928-96-1	122,34	0,929
<i>Octanoato de etilo</i>	141-78-6	199,97	3,211
<i>Linalool</i>	78-70-6	186,89	2,130
<i>Ácido butírico</i>	107-92-6	88,11	0,838
<i>Furfuryl alcohol</i>	98-00-0	98,30	0,099
<i>Eugenol</i>	97-53-0	164,20	2,511
<i>Vainillina</i>	121-33-5	152,15	1,516

Los patrones fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y todos eran de calidad analítica.

- Metanol n° CAS: 67-56-1, J.T. Baker. PM= 32.04 g/mol
- Acetonitrilo n° CAS: 75-05-8, Scharlau. PM= 41.05 g/mol

##### 3.1.2. Telas FPSE

PTHF (Polytetrahydrofuran), PEG (Polyethylene glycol) y PDMS (polidimetilsiloxano). Las telas fueron suministradas por el Profesor Abuzar Kabir de la Universidad de Florida.

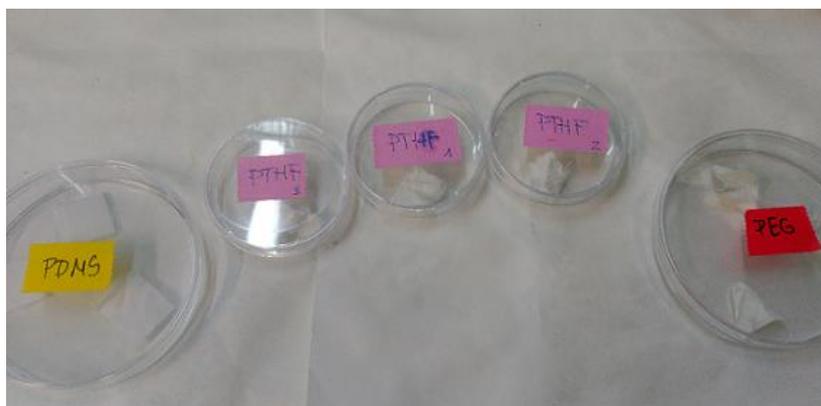


Ilustración 4. Telas FPSE. De izquierda a derecha PMDS, PTHF y PEG.

### 3.1.3. Muestras

Para observar la eficacia de las telas con alimentos, se cogieron unas muestras de agua con sabores a limón y naranja del supermercado.



Ilustración 5. Muestras de agua de refresco de limón (izquierda) y naranja (derecha).

### 3.1.4. Preparación de las disoluciones

#### 3.1.4.1. Preparación de la disolución madre de 200 ppm

Para preparar la disolución madre de cada reactivo se utiliza en reactivo puro, el disolvente y un vial de 20 ml. La manera de prepararlo es por pesada y se controla gravimétricamente que no hay pérdida de peso. Una vez preparado se agita, y se etiqueta. Todo esto es anotado en el libro de patrones con su respectivo número DIS y su concentración final.



Ilustración 6. Disoluciones madre de 200 ppm

Tabla 3. Libro de patrones de las disoluciones madre.

DIS	Compuesto	Concentración( $\mu\text{g/g}$ )
258	Butirato de etilo	1674,6
259	Isovalerato de etilo	7336,2
260	Furfuryl alcohol	2332,4
261	Cis-3-hexen-1-ol	1688,3
262	Octanoato de etilo	5346,5
263	Octanal	1773,6
264	Eugenol	2218,1
265	Linalool	1744,9
266	1-octen-3ona	1491,0
267	Limoneno	1692,4
268	Diacetilo	1906,4
269	Ácido butírico	1798,2
282	Vainillina	1794,0

#### 3.1.4.2. Preparación de la disolución conjunta de 20ppm

Para preparar esta disolución conjunta, hay que tener en cuenta la concentración de cada disolución madre previamente preparada. Para conseguir que la concentración de cada compuesto sea 20ppm hay que añadir los volúmenes marcados en la tabla:

Tabla 4. Volumen añadido de cada compuesto v su pesada.

DIS	Cantidad (ml)	Peso (g)	DIS	Cantidad (ml)	Peso (g)
258	1,25	0,9133	265	1,20	0,8900
259	0,30	0,2211	266	1,30	0,9610
260	0,90	0,6177	267	1,20	0,9184
261	1,20	0,8355	268	1,05	0,7101
262	0,40	0,3100	269	1,10	0,7713
263	1,10	0,7695	282	1,10	0,8490
264	0,90	0,6490			

## 3.2. ANÁLISIS POR CG-MS

### 3.2.1. Equipo

Se trabajó con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas HP5973 de la casa Agilent (Barcelona, España). El equipo estaba conectado a un inyector automático Combipal® también de la casa Agilent. Se utilizó una columna DB20 (30m x 0.25mm x 0.2µm). El gas portador fue Helio con un caudal de 1ml/min.

### 3.2.2. Condiciones de análisis: de la cromatografía de gases y de la detección por MS

#### 3.2.2.1. Condiciones cromatográficas

El volumen de inyección fue de 1 µL y se inyectó en modo splitless. El programa del horno cromatográfico fue: 40°C (4min), rampa de 10°C/min hasta 160°C, rampa de 15°C/min hasta 220°C y 8 min a la temperatura final.

#### 3.2.2.2. Detección MS en modo SCAN

La detección en modo SCAN se llevó a cabo en el rango de masas de 50 a 400. Inicialmente se inyectó la disolución de la mezcla de 20ppm en modo SCAN para obtener los tiempos de retención de los compuestos seleccionados.

#### 3.2.2.3. Detección MS en modo SIM

La cuantificación de los analitos se llevó a cabo en modo SIM. La tabla 5 muestra los iones cuantificados y los iones de confirmación para cada analito.

En la inyección splitless la totalidad de la muestra es inyectada hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. Las ventajas que supone son: notable aumento de la sensibilidad debido a la no división de la muestra y la reconcentración de la muestra en la cabeza de la columna supone que las pérdidas de eficacia en una inyección inadecuada sean de menor importancia (CSIC, 2015).

Tabla 5. Grupos de compuestos CG-MS Modo SIM

SIM (tiempo retención)	Compuestos	T <sub>R</sub>	Q	C
Grupo 1 (5,1-8,1)	Diacetilo	5.8	86	-
	Butirato de Etilo	6.58	71	88
	Isovalerato de Etilo	6.75	88	85
Grupo 2 (8,1-12,4)	Limoneno	8.82	93	136
	Octanal	10.9	84	69
	1-octen-3-ona	10.99	70	97
	Z-3-hexenol	11.94	67	82
Grupo 3 (12,4-18,0)	Octanoato de Etilo	13.04	88	101
	Linalool	14.2	93	121
	Ácido butírico	15.17	60	73
	Furfuryl alcohol	15.76	98	81
Grupo 4 (18,0-28,0)	Eugenol	20.14	164	149
	Vainillina	23.75	151	108

Con este modo se consigue aumentar la concentración de los compuestos, incluyendo el ion de cuantificación y el ion de confirmación del compuesto.

### 3.3. EXTRACCIÓN POR FPSE

#### 3.3.1. Protocolo general de extracción FPSE

Las condiciones de volumen de muestra y tiempo de extracción, así como las condiciones de limpieza, se cogieron de los estudios previos realizados (Kumar, 2014).

##### A. Limpieza y preparación de las telas

- Limpieza de las telas en el equipo de ultrasonidos mediante inmersión en 5ml de MeOH-Acetonitrilo (50:50) durante 30 minutos.

##### B. Las etapas de la extracción por FPSE son las siguientes:

- Retención de los analitos en el tejido FPSE: En esta etapa una alícuota de la disolución que contiene los analitos se transfiere a un vial, el tejido FPSE se añade a la disolución, se añade un agitador magnético y el vial se cierra herméticamente. El vial se cierra y la disolución junto con el tejido FPSE se ponen en agitación.
- Extracción de los tejidos FPSE con un solvente orgánico: Una vez finalizada la etapa anterior, el tejido FPSE es extraído de la disolución y depositado en un vial eppendorf. En el vial se añade 1ml del solvente orgánico de extracción, con la ayuda de una espátula pequeña se empuja unas 20 veces para mezclar bien tejido y solvente. Después se llevan al equipo de ultrasonidos durante 10 minutos, una vez pasado este tiempo, se vuelve a empujar la tela con la espátula otras 20 veces con la manera de mejorar la homogeneidad del líquido. Después se extrae con la jeringuilla y se pasa al vial a través del filtro de 0.20  $\mu\text{m}$ . El filtrado se pasa a un vial donde será inyectado.
- Por último, se introducen las telas en otros eppendorf con 1ml de MeOH-Acetonitrilo 50:50 durante 30 minutos en el equipo de ultrasonidos. Se secan las telas y se depositan en sus respectivas placas de Petri para volver a ser utilizadas otra vez.

### 3.3.2. Optimización de la extracción

#### 3.3.2.1. Optimización de la etapa extracción de los tejidos FPSE

En esta etapa se optimizó el disolvente de extracción, se utilizaron metanol, acetonitrilo y una mezcla de ambos al 50%. Las condiciones de extracción se tomaron de trabajos previos realizados en el laboratorio (Aznar et al, 2014), donde se había llevado a cabo la optimización del tiempo de extracción así como el uso de ultrasonidos en esta etapa. Para la optimización se llevan a cabo las siguientes etapas:

- Se dopan las telas con 20µl de una disolución conjunta de 10ppm y se introducen en el eppendorf.
- Se introduce 1ml del solvente de extracción en el eppendorf. Con la ayuda de una espátula pequeña se empuja unas 20 veces para homogeneizar bien la muestra. Después se llevan al equipo de ultrasonidos durante 30 minutos.
- Una vez pasado este tiempo, se vuelve a empujar la tela con la espátula otras 20 veces con la manera de mejorar la homogeneidad del líquido. Después se extrae con la jeringuilla y se filtra y se pasa al vial.
- Se realizan paralelamente blancos del tejido donde se sigue el mismo proceso pero sin dopar las telas al inicio.

Las extracciones se llevaron a cabo por triplicado.

#### 3.3.2.2. Optimización de la etapa de retención de los analitos en el tejido FPSE

Se tuvieron en cuenta las siguientes variables para el proceso de retención:

- Volumen de muestra: basándonos en un anterior experimento de Kumar (Kumar, 2014) se utilizó 15ml, 50 ml y 100ml.
- Tiempo del proceso de retención FPSE: teniendo en cuenta el experimento citado anteriormente (Kumar, 2014), también se utilizaron tres tiempos distintos. Estos tiempos fueron 15 min, 30 min y 60 min.

Para llevar a cabo la optimización, se prepara la disolución donde se van a introducir las telas en agitación. Para ello, se coge la disolución volátil de 20ppm y se hace una dilución de 200ppb a partir de esta con metanol. Se anota el peso de la dilución de 20ppm y se enrasa con el metanol en el matraz y se agita. Tras el proceso de retención el tejido FPSE, los tejidos fueron depositados en un eppendorf y extraídos con 1ml de metanol siguiendo el protocolo general de extracción. El extracto fue filtrado, transvasado a un vial e inyectado en GC-MS en modo SIM.

### 3.3.2.3. Optimización de la etapa de agitación

Se probaron diferentes velocidades de agitación (de 500 a 1000rpm) en un agitador magnético (IKA RT10, Alemania) para conseguir que los tejidos FPSE fueran agitados de forma homogénea, finalmente se seleccionó 900rpm. Se colocan encima del agitador magnético y se comienza la prueba (900rpm).

### 3.3.2.4. Optimización de la etapa de limpieza

Se introducen las telas de nuevo en los eppendorf y se introduce 1ml de metanol-acetonitrilo 50:50 para proceder a la limpieza de la tela. Se llevan al equipo de ultrasonidos donde permanecerán durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se extraen las telas se secan y se vuelven a depositar en las placas de Petri para una nueva utilización.



Ilustración 7. Agitación de las telas

### 3.3.3. Protocolo final de extracción

Tabla 6. Protocolo final de extracción

<b>Etapas optimizadas</b>	<b>Volumen</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Observaciones</b>
Limpieza	1ml	MeOH-AN 50:50	30'	Ultrasonidos
Retención-Agitación	100ml	-	60'	900rpm
Extracción	1ml	MeOH 100%	10'	Ultrasonidos

#### 3.3.4. Comparación de la extracción de los compuestos en las diferentes telas

Se preparó una disolución mixta volátil con una concentración de los compuestos aproximada de 200ppb.

Se pasó al procedimiento extracción usando el protocolo optimizado de extracción, cada tela por triplicado. Después se llevó al equipo de ultrasonidos para la extracción con 1ml metanol durante 10 minutos. Por último, se pasó al vial donde se llevó al cromatógrafo para analizar las áreas de cada pico.

#### 3.3.5. Adición de NaCl al 10% para mejorar la extracción

Para prepararlo se prepararon una disolución mixta volátil con una concentración de los compuestos aproximada de 200ppb. A 200ml de esta disolución se le añadió NaCl al 10%. Otros 200ml se conservaron sin NaCl.

Una vez preparadas las disoluciones se procedió al procedimiento de extracción de las telas siguiendo el protocolo optimizado de extracción. Primero colocando las telas en agitación durante 60 minutos con un volumen de 100ml (dos replicas por cada muestra). Después se llevó al equipo de ultrasonidos para la extracción con 1ml metanol durante 10 minutos. Por último, se pasó al vial donde se llevó al cromatógrafo para analizar las áreas de cada pico.

#### 3.4. Análisis de muestras

Para observar la eficacia de las telas con alimentos, se cogieron unas muestras de agua con sabores a limón y naranja del supermercado. Previamente a la extracción las muestras fueron diluidas 1:5 con agua milliQ, ya que se trataba de muestras muy concentradas. La extracción de las muestras se llevó a cabo siguiendo el protocolo final de extracción. En este análisis se utilizaron dos programas diferentes análisis, el modo SIM para detectar si había alguno de los compuestos con los que se había trabajado y la concentración que había de ellos; y el modo SCAN para identificar todos los componentes volátiles presentes en la muestra.

Los análisis se realizaron por duplicado.

#### 4. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

##### 4.1. Rectas de calibración y parámetros analíticos

##### 4.1.1. Ecuaciones de la recta, límites de detección y límites de cuantificación

Se preparó una recta de calibrado para optimizar el área obtenida en el cromatógrafo de gases. Con ello, se consiguió tener una recta de calibrado para cada compuesto y con una ecuación de la recta para calcular la concentración de cada compuesto con los datos recogidos en el cromatógrafo. Decir que salvo para el butírico, el LOD estaba por debajo de 15ppb.

Tabla 7. Datos de las rectas de calibrado.

<b>Compuesto</b>	<b>Ecuación</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Rango trabajo</b>
Diacetilo	$y = 42,225x + 11650$	0,9963	40ppb-2ppm
Butirato de etilo	$y = 343,7x - 2066$	0,998	40ppb-2ppm
Isovalerato de etilo	$y = 313,75x - 2596,9$	0,9981	40ppb-2ppm
Limoneno	$y = 382,43x - 4208,2$	0,999	40ppb-2ppm
Octanal	$y = 64,256x - 2142,5$	0,9973	40ppb-2ppm
1-octen-3ona	$y = 218,77x - 13570$	0,9946	40ppb-2ppm
Z-3-hexenol	$y = 206,44x - 9899,6$	0,9978	40ppb-2ppm
Octanoato de etilo	$y = 290,16x - 18869$	0,9925	40ppb-2ppm
Linalool	$y = 161,04x - 12579$	0,9916	40ppb-2ppm
Ácido butírico	$y = 34,174x - 5969,3$	0,9824	100ppb-2ppm
Furfuryl alcohol	$y = 136,66x - 9345,6$	0,9935	40ppb-2ppm
Eugenol	$y = 206,07x - 17209$	0,9868	40ppb-2ppm
Vainillina	$y = 195,92x - 12388$	0,9892	40ppb-2ppm

#### 4.1.2. Cromatograma SIM

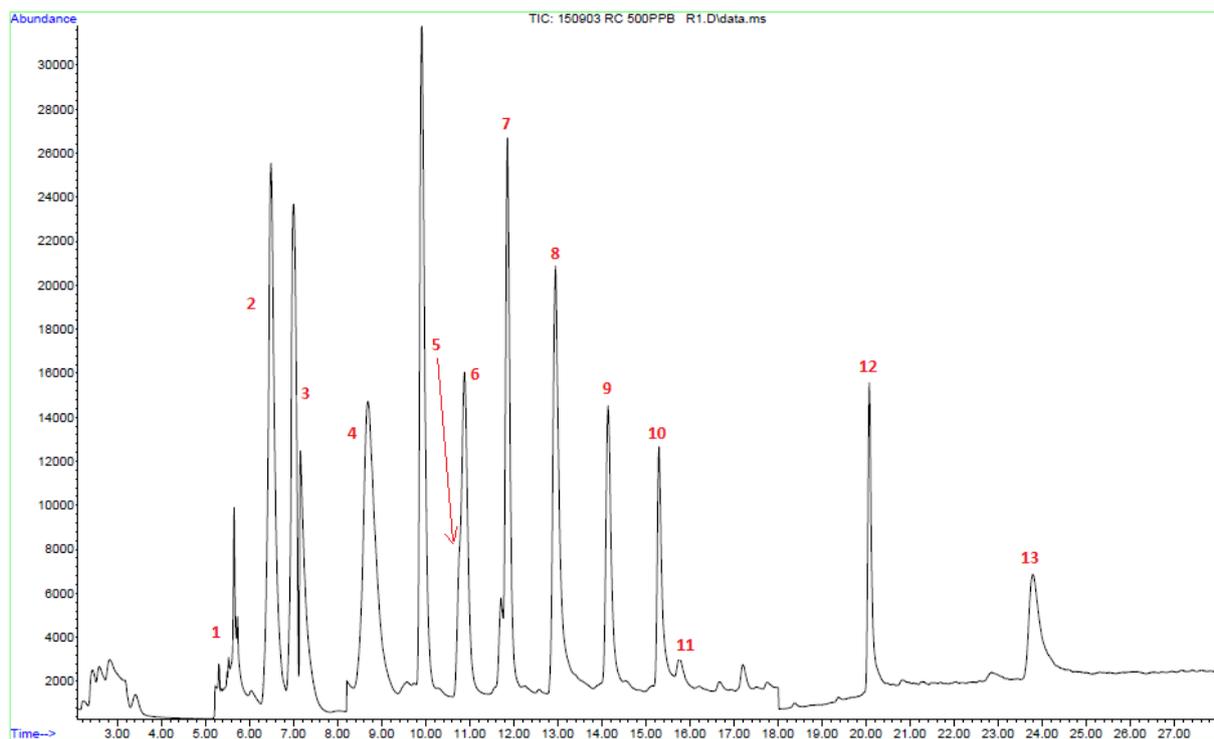


Ilustración 8. Cromatograma SIM de una disolución mix volátil de 500ppb. De izquierda a derecha, numerados todos los picos de los correspondientes compuestos de trabajo: (1) diacetilo, (2) butirato de etilo, (3) isovalerato de etilo, (4) limoneno, (5) octanal, (6) 1Octen-3ona, (7) Z-3-hexenol, (8) octanoato de etilo, (9) linalool, (10) ácido butírico, (11) furfuryl alcohol, (12) eugenol y (12) vainillina.

#### 4.1.3. Figuras de las rectas de calibrado de cada compuesto

Aparecen recogidos en el Anexo I todas las rectas de calibrados de los 13 compuestos con sus respectivas ecuaciones de la recta y línea de tendencia.

#### 4.2. Optimización de la extracción con FPSE

##### 4.2.1. Optimización de la back-extraction

Se optimizó el disolvente de extracción de los compuestos volátiles en la tela. Para seleccionar uno u otro disolvente, se doparon las telas con 20µl de la disolución mixta volátil de 20 ppm, para intentar extraer 400ppb de cada compuesto aproximadamente. El tiempo y el volumen de extracción en el ultrasonidos son los del protocolo final de extracción.

El proceso de extracción se realizó seis veces con cada tela para obtener un valor medio para las posibles desviaciones que pudiera haber (Tabla 1, Anexo I). Los resultados, como se puede observar en la siguiente tabla, son los siguientes:

*Tabla 8. Comparación de la utilización de metanol o acetonitrilo como disolvente de extracción.*

Compuestos	Metanol		Acetonitrilo	
	% Recuperación	RSD	% Recuperación	RSD
Diacetilo	0	-	0	-
Butirato de etilo	91,5	20,2	9,6	65,0
Isovalerato de etilo	53,5	22,4	41,9	-
Limoneno	82,6	18,0	63,7	1,6
Octanal	56,9	8,7	50,0	3,5
1-octen-3ona	73,1	11,8	68,4	3,2
Z-3-hexenol	66,5	8,2	63,1	4,9
Octanoato de etilo	78,9	10,0	72,8	6,2
Linalool	72,6	7,1	68,6	2,9
Ácido butírico	50,2	63,4	57,2	19,4
Furfuryl alcohol	74,2	8,6	75,2	4,7
Eugenol	84,3	8,1	84,0	6,1
Vainillina	65,4	15,1	77,0	2,9
<b>MEDIA</b>	<b>70,80</b>	-	<b>60,96</b>	-

Todos los compuestos excepto el ácido butírico, el furfuryl alcohol y la vainilla se extraen mejor con metanol. En ambas extracciones, se excluyen los resultados del diacetilo ya que los valores están fuera de la recta de la recta de calibrado. El % medio de extracción con metanol es de 70,80% obteniendo el mayor porcentaje con el compuesto butirato de etilo (91,5%) y el menor el ácido butírico con 50,19%. El % medio de extracción con acetonitrilo es de 60,69% obteniendo el mayor porcentaje con eugenol (83,97%) y el menor el butirato de etilo con 9,63%.

Se concluye que el disolvente con el que vamos a extraer es el metanol, ya que es el que mejor responde a la extracción de los compuestos.

#### 4.2.2. Optimización de la extracción

En el siguiente apartado de resultados se muestra la relación de la señal obtenida para cada compuesto, en el proceso de optimización de la retención en el tejido FPSE (Tabla 2, anexo I) (figuras 9-20)

Como se puede observar, se estudiaron tres volúmenes (15, 50 y 100ml) y tres tiempos (15, 30 y 60 minutos) durante la optimización, los análisis se llevaron a cabo siempre en agitación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Una vez realizado el experimento y el proceso de extracción, se pincharon en el cromatógrafo de gases para obtener las áreas de los picos de cada compuesto.

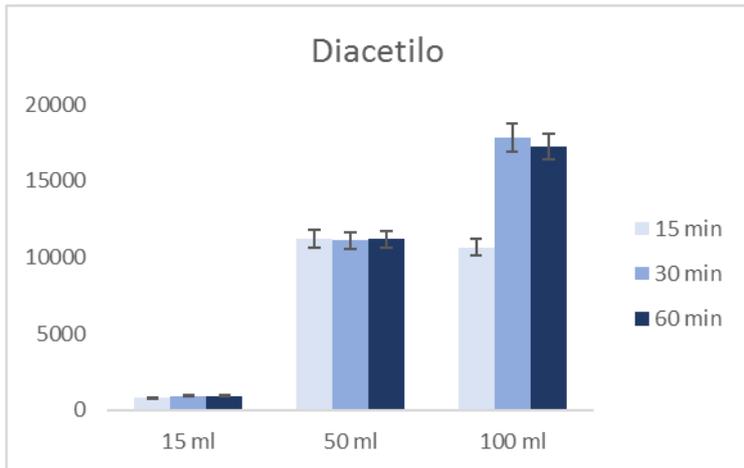


Ilustración 9. Área volumen-tiempo diacetilo

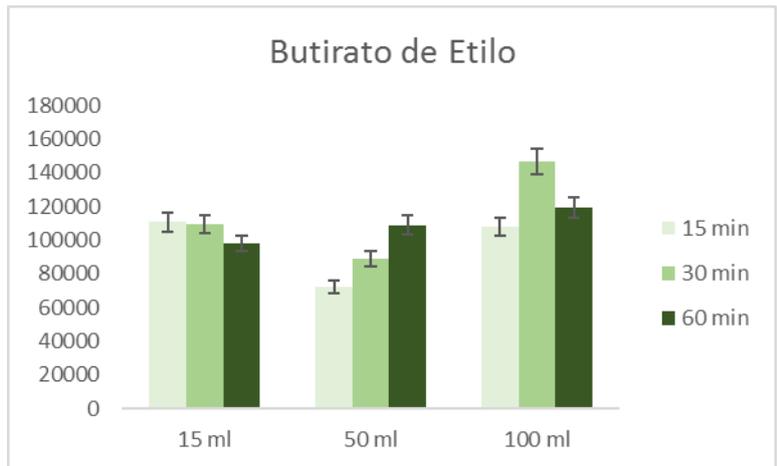


Ilustración 10. Área volumen-tiempo butirato de etilo

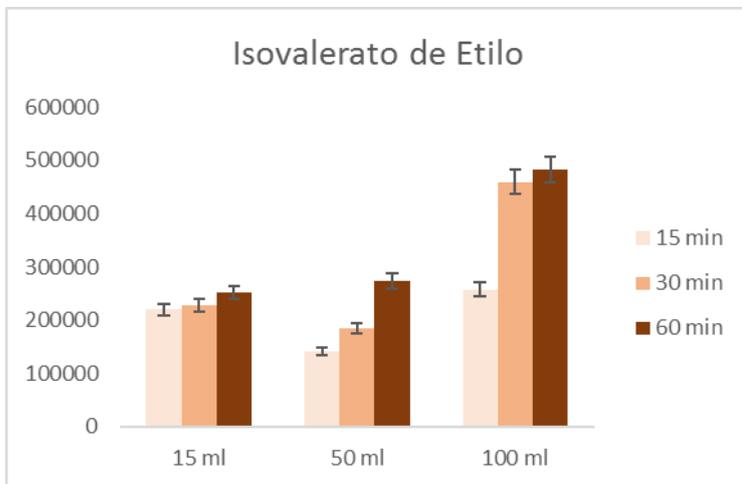


Ilustración 11. Área volumen-tiempo isovalerato de etilo

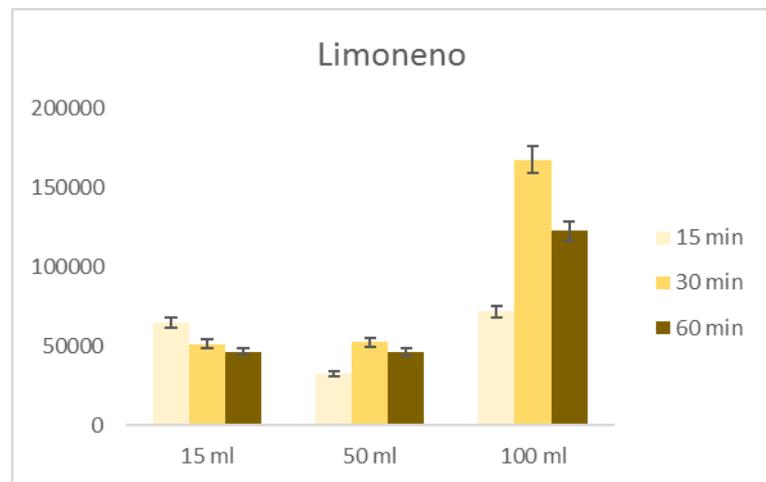


Ilustración 12. Área volumen-tiempo limoneno

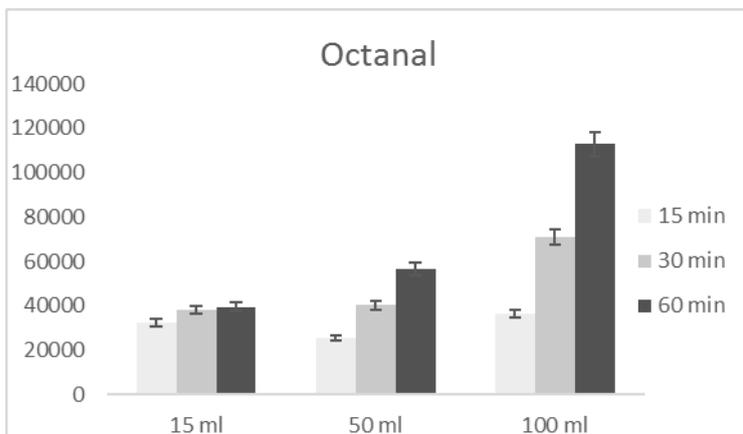


Ilustración 13. Área volumen-tiempo octanal

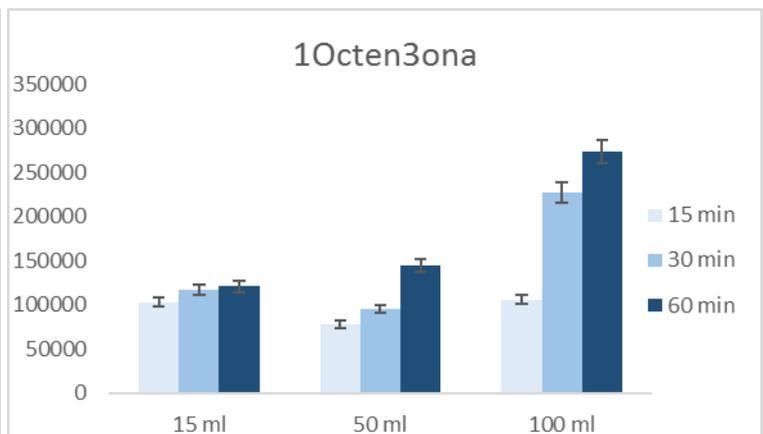


Ilustración 14. Área volumen-tiempo 10octen3ona

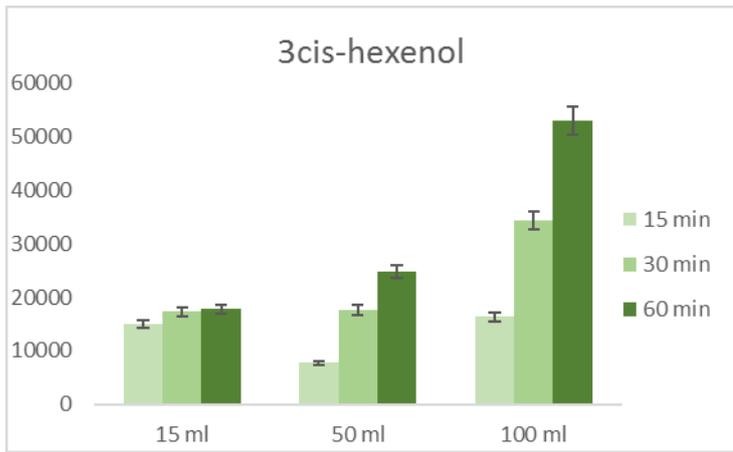


Ilustración 15. Área volumen-tiempo 3cishexenol

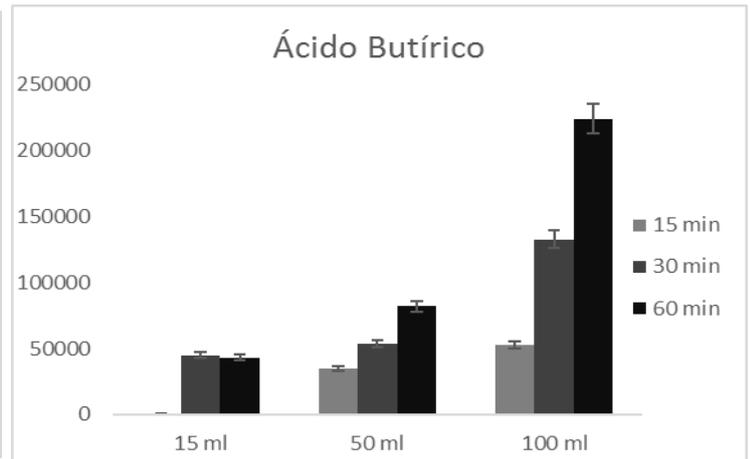


Ilustración 16. Área volumen-tiempo ácido butírico

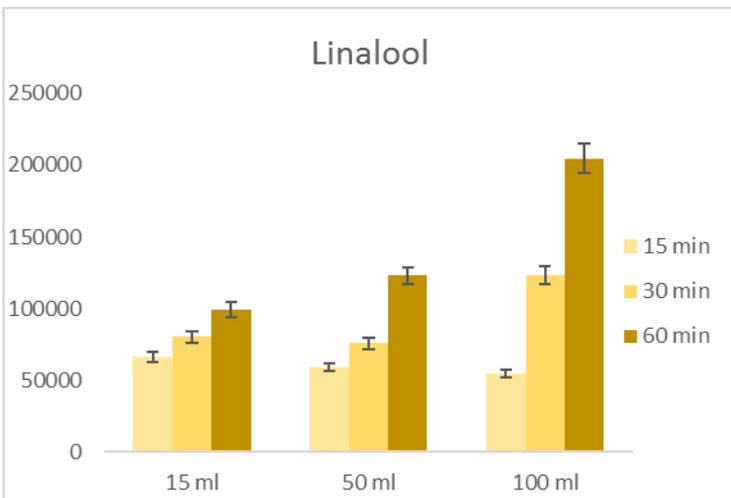


Ilustración 17. Área volumen-tiempo linalool

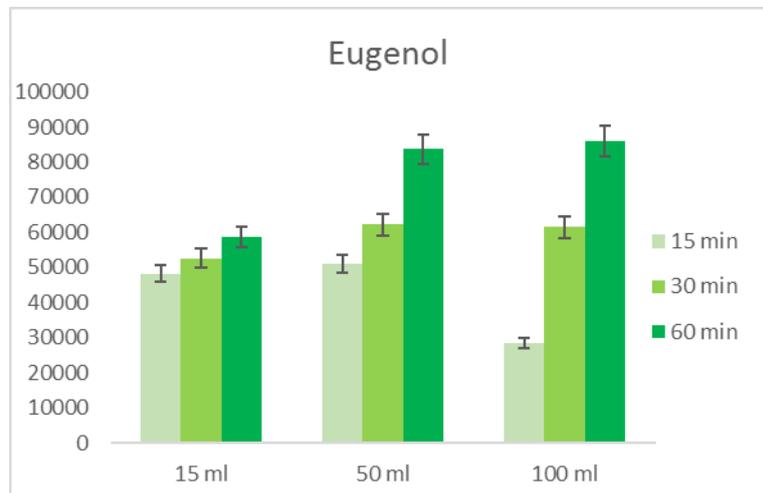


Ilustración 18. Área volumen-tiempo eugenol

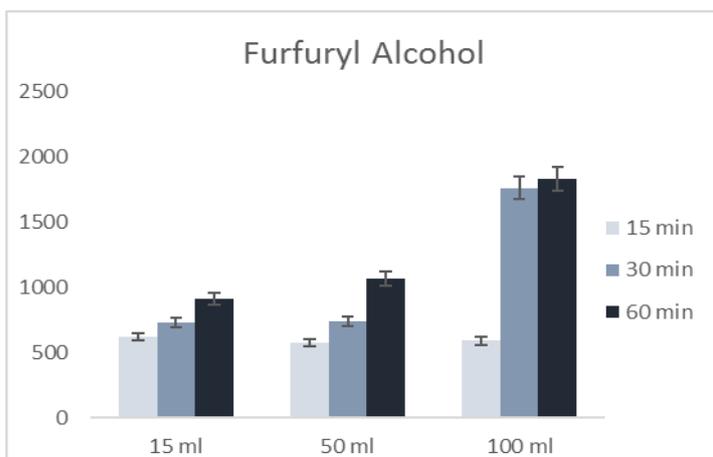


Ilustración 19. Área volumen-tiempo furfuryl alcohol

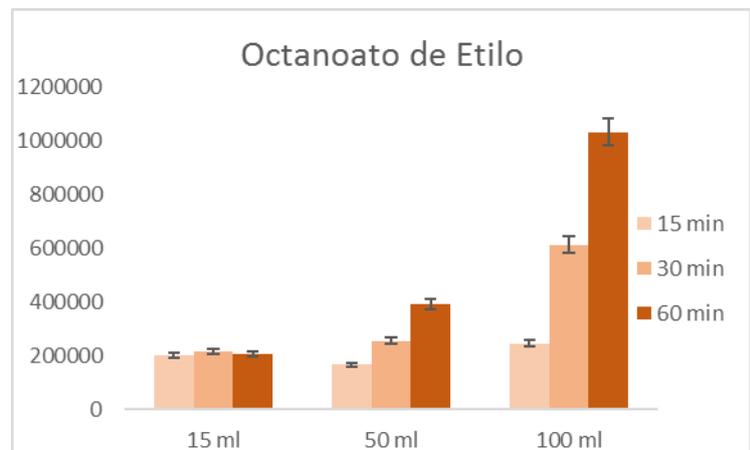


Ilustración 20. Área volumen-tiempo octanoato de etilo

Los resultados, como se puede observar, son los siguientes:

- Cuando el volumen de muestra era de 15ml el tiempo tenía muy poca influencia en la cantidad extraída de los compuestos. Solo en algunos compuestos como el eugenol o el furfuryl alcohol se vio un aumento, pero muy pequeño. En 50ml y 100ml un aumento en el tiempo de contacto entre el tejido y la disolución sí que producía un aumento del área de los compuestos. Estos resultados tienen sentido ya que un mayor volumen de muestra puede necesitar mayor tiempo de contacto con el tejido para que todo el volumen pase a través del mismo.
- Como se puede observar en las ilustraciones 10, 11 y 13, el tiempo a veces tenía un efecto negativo, probablemente por la alta volatilidad de estos compuestos.
- Comparando distintos volúmenes de muestra a un mismo tiempo de extracción, se observa que mayores volúmenes de muestra daban mayores señales.
- No se muestra el área de la vainillina ya que en este experimento se encontraba por debajo del límite de detección.

Se concluye observando los gráficos que la extracción óptima para la mayoría de los compuestos tiene lugar cuando se realiza con 100ml de muestra y 60 minutos de tiempo de extracción.

#### 4.2.3. Comparación de la extracción de los compuestos en las diferentes telas

En esta parte de los resultados se compararon las tres telas de diferentes polaridades, PEG (glicol de polietileno), PMDS (polidimetilsiloxano) y PTHF (politetrahidrofurano). Los compuestos mostrarán mayor o menor afinidad dependiendo de su log P.

Los resultados obtenidos son los siguientes:

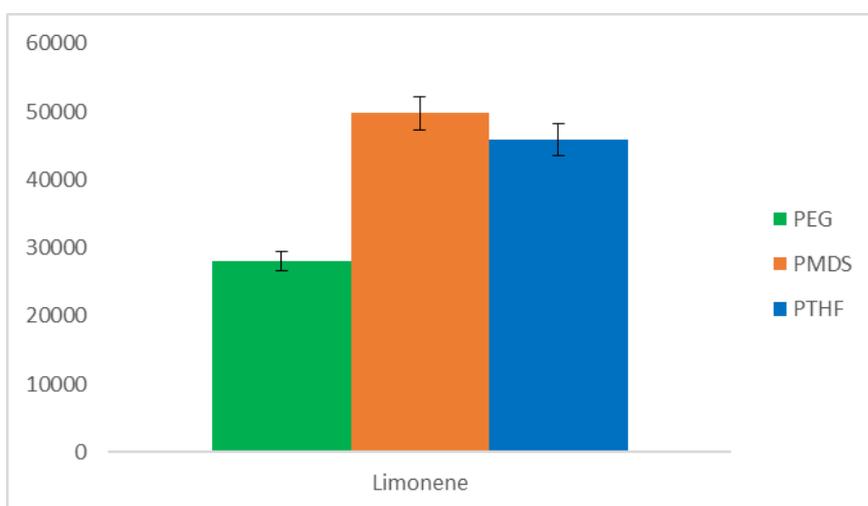


Ilustración 21. Comparación de las telas en el limoneno.

El limoneno es el compuesto más apolar ( $\log P = 3,604$ ) y su mayor extracción se produjo con la tela PMDS (ilustración 21). Este compuesto sigue la dinámica de extracción prevista ya que la tela más polar es la que menor área de compuesto recoge.

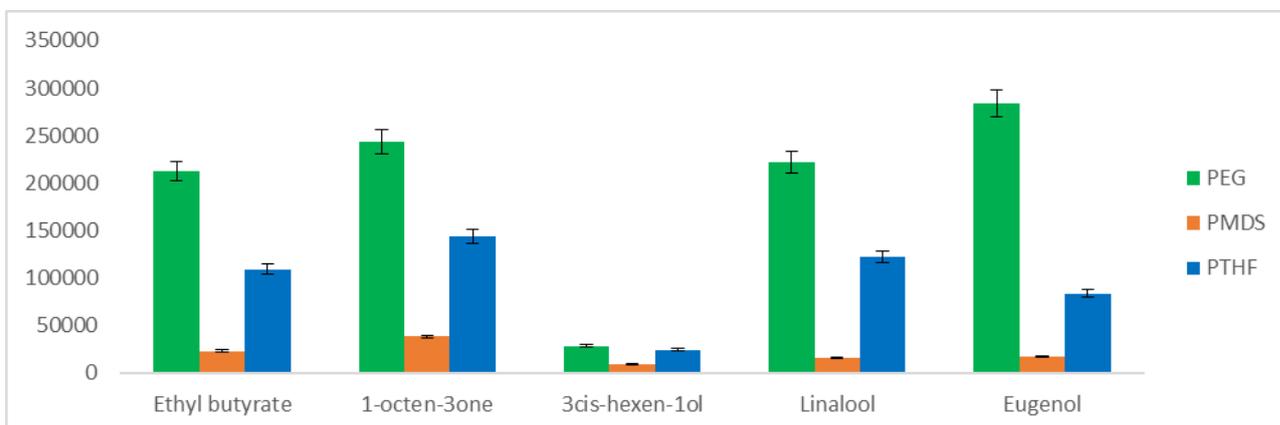


Ilustración 22. Comparación de las telas en varios compuestos.

En el grupo de compuestos mostrado en la ilustración 22, se produjo una mayor extracción con la tela PEG (mayor polaridad). Algunos de estos compuestos, como el butirato de etilo y el 3cishexenol, sí tenían una alta polaridad y respondieron por tanto de la forma prevista. La 1-octen-3-ona, el linalool y el eugenol tenían sin embargo una polaridad menor, lo que indica que el proceso de retención depende de más factores como pueden ser los grupos funcionales o la estructura de los compuestos.

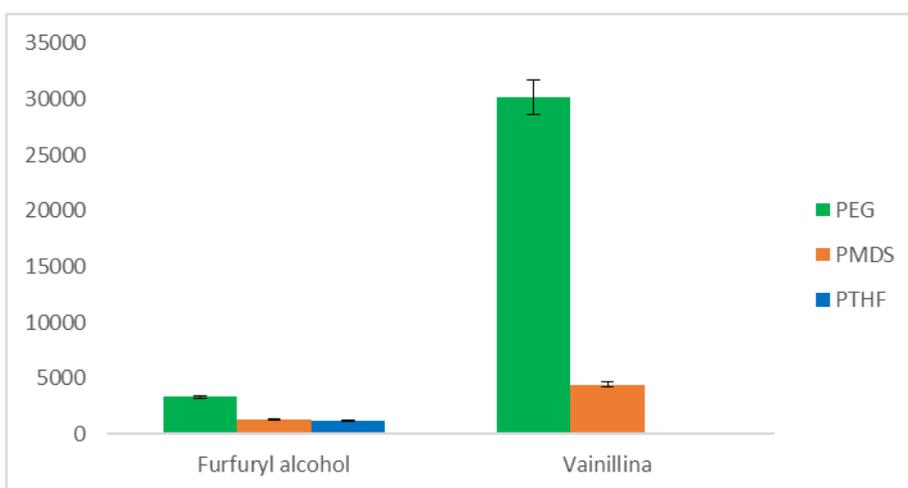


Ilustración 23. Comparación de las telas en furfuryl alcohol y vainillina.

Los compuestos de la ilustración 24, furfuryl alcohol y vainillina, tienen una  $\log P$ , es decir, una alta polaridad (0,099 y 1,516, respectivamente) y la mayor extracción se produjo con la tela PEG como era de espera.

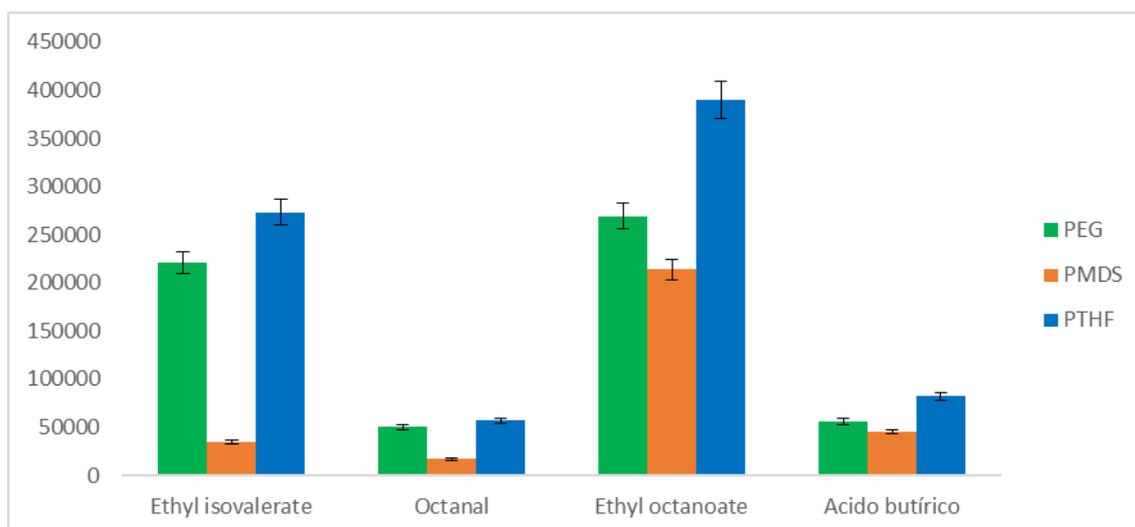


Ilustración 24. Comparación de las telas en varios compuestos.

El área de extracción de estos los compuestos de la ilustración 25, isovalerato de etilo, octanal, octanoato de etilo y ácido butírico, que tienen una polaridad intermedia, fue mayor con el tejido PTHF, también de polaridad intermedia..

#### 4.2.4. Adición de NaCl al 10% para mejorar la extracción

Después de realizar los anteriores experimentos para optimizar las condiciones de extracción, se pensó en mejorar estas condiciones de nuevo añadiendo a la disolución mixta volátil NaCl (cloruro de sodio) al 10%. Lo que se pretendió al añadir esta disolución era aumentar la fuerza iónica con las moléculas de NaCl para favorecer la extracción de los compuestos en la tela y que esta mejora fuera significativa.

Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 9. Áreas de compuestos con NaCl al 10% y sin NaCl

Compuesto	Media NaCl	Media Sin
Diacetilo	17895.5	15850.0
Butirato de etilo	127013.5	89940.0
Isovalerato de etilo	183412.5	148564.5
Limoneno	27002.0	171313.5
Octanal	58266.0	44825.0
1-octen-3ona	214694.5	159643.5
3cis-hexen-1ol	30905.0	23068.0
Octanoato de etilo	258060.0	238181.5
Linalool	233629.0	161394.0
Acido butírico	55447.5	49764.5
Furfuryl alcohol	2585.5	3279.0
Eugenol	175416.0	125457.5
Vainillina	12479.5	17014.5

Como se puede observar, se aprecia una mejoría de extracción con la adición de NaCl al 10%, salvo en los compuestos furfuryl alcohol y vainillina. Sin embargo un análisis estadístico con la prueba t de Student determinó que las diferencias no eran significativas ( $p = 0.45$ ). Con lo que se concluyó que la adición de NaCl al 10% mejoraba la capacidad de extracción de los compuestos en la tela pero no de manera significativa.

#### 4.3. Evaluación del método

Una vez optimizado el método, se realizó la extracción en una muestra de 200ppb y en una muestra de 50ppb (con 4 réplicas) con las condiciones del protocolo final de análisis. Con ello se evaluó el factor de concentración del mismo, haciendo la media con todos los compuestos salvo el de la vainillina. Para ello se utilizó la recta de calibrado de cada compuesto. Los resultados obtenidos en este apartado se muestran en la tabla 10:

*Tabla 10. Factor de concentración de una muestra de 200ppb y otras de 50ppb con las condiciones del protocolo final de extracción.*

Compuestos	Factor de concentración
	200ppb
Diacetilo	2.8
Butirato de etilo	1.1
Isovalerato de etilo	8.8
Limoneno	2.7
Octanal	3.2
1-octen-3ona	2.9
Z-3-hexenol	1.3
Octanoato de etilo	7.9
Linalool	4.6
Ácido butírico	9.9
Furfuryl alcohol	0.9
Eugenol	1.6
<b>MEDIA</b>	<b>4.0</b>

Finalmente decir que fue posible la detección de todos los compuestos excepto el ácido butírico en la disolución de 50ppb, lo cual es muy positivo porque permite el análisis de volátiles en agua a bajas concentraciones

#### 4.4. Análisis de compuestos volátiles en aguas de sabores

Se analizaron las muestras en modo SCAN para detectar todos los compuestos presentes en el agua y en modo SIM para localizar posibles compuestos con los que se había trabajado.

El análisis en modo SIM mostró que ninguno de los componentes con los que se había trabajado aparecía en las muestras de agua embotellada, únicamente en el agua de sabor limón apareció limoneno por debajo del límite de cuantificación.

Para los análisis en modo SCAN, se decidió a concentrar el extracto obtenido con metanol, mediante corriente de nitrógeno., consiguiendo reducir el volumen a una cuarta parte y aumentar la sensibilidad de los compuestos en la muestra.

En el análisis de las aguas de refresco concentradas se llegaron a detectar 12 compuestos volátiles en el agua con sabor a limón y 11 compuestos volátiles en el agua con sabor a naranja (Tabla 11). Los compuestos se identificaron con la librería NIST. Se buscó información en una página web (The Good Scents Company, 2015) para relacionarlos con el sabor y aroma del limón y la naranja.

##### 4.4.1. Tabla de compuestos detectados en limón y naranja

Tabla 11. Compuestos detectados en las muestras concentradas de agua con sabor a limón y naranja.

(\*)Compuestos detectados sólo en el agua con sabor limón.

TR	Compuesto	CAS	AROMA
12.98	FURFURAL	98-01-1	dulce, madera, tostado, caramelo,
13.89	hydroxydihydromaltol	28564-83-2	dulce, caramelo
14.23	5-methyl furfural	620-02-2	dulce, caramelo, tostado, café
14.6	fenchyl acetate	13851-11-1	pino fresco, cítrico dulce
14.9	4-terpineol	562-74-3	madera, mentolado, cítrico, especiado
15.3	2-furanmethanol	98-00-0	humedad, dulce, madera, tostado, café
16.03	alfa terpineol	98-55-5	pino, lila, cítrico, madera, floral
18.58	dimethyl furfural	52480-43-3	
18.84	methyl furoate*	13129-23-2	baya, afrutado
19.56	tiophene methanol	636-72-6	café tostado
20.68	hydroxydihydromaltol	28564-83-2	dulce, caramelo
22.7	5-hydroxymethyl furfural	67-47-0	grasa, mantequilla, húmedo, ceroso, caramelo

#### 4.4.2. Cromatograma de la muestra de limón concentrada

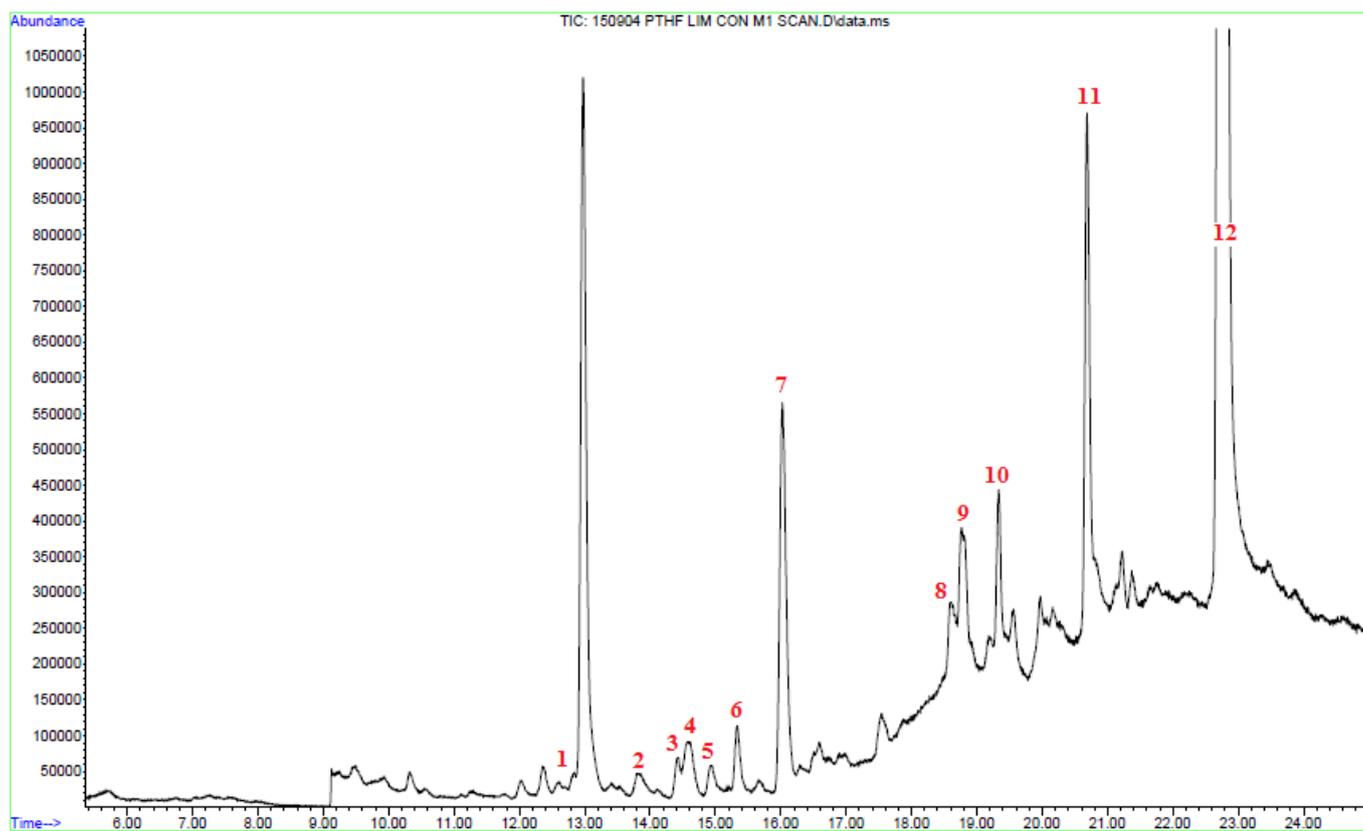


Ilustración 25. Cromatograma modo SCAN de la muestra de agua con sabor a limón concentrada. De izquierda a derecha los picos identificados: (1) furfural, (2) hydroxydihydromaltol, (3) 5-methyl Furfural, (4) fenchyl acetate, (5) 4-terpineol, (6) 2-furanmethanol, (7) alfa terpineol, (8) dimethyl Furfural, (9) methyl furoate, (10) tiophene methanol, (11) hydroxydihydromaltol, (12) 5-hydroxymethyl Furfural.

## 5. CONCLUSIONES

El trabajo realizado ha permitido el diseño de un método de extracción por FPSE para el análisis de compuestos volátiles en muestras acuosas. El protocolo final de extracción tras la optimización fue el siguiente:

<b>Etapa optimizada</b>	<b>Volumen</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Observaciones</b>
Limpieza	1ml	MeOH-AN 50:50	30'	Ultrasonidos
Retención-Agitación	100ml	-	60'	900rpm
Extracción	1ml	MeOH 100%	10'	Ultrasonidos

El método permitió la extracción de varias muestras de forma simultánea de forma sencilla y rápida, estimando el tiempo total de extracción en 70 minutos., lo cual es muy positivo. A su vez, los resultados mostraron una buena capacidad de extracción, permitiendo detectar los compuestos seleccionados a una concentración de 50ppb en la disolución acuosa. El análisis de compuestos volátiles se lleva a cabo en la mayoría de los casos mediante cromatografía de gases (GC) y dado que en los sistemas de GC no es recomendable la inyección de muestras acuosas este método, que permite la transferencia de los compuestos de la matriz acuosa a un solvente orgánico, resulta de gran utilidad.

El estudio de la extracción con los distintos tejidos (PEG, PDMS y PTHF) confirmó la importancia de la selección del sorbente en función de los analitos que se vayan a analizar. En el caso de los compuestos volátiles seleccionados, el PTHF y PEG resultaron eficaces para la mayor parte de ellos.

La aplicación del método al análisis de las muestras de refrescos fue de gran interés, ya que fue posible la identificación de compuestos tales como fenchyl acetate o alfa terpineol responsables del aroma de estos refrescos.

Por tanto, se puede decir que es un método de las telas es fiable a la hora de cuantificar componentes volátiles en aguas y refrescos, pero para saber su concentración previamente habría que realizar una recta de calibrado de estos.

## Conclusions

This work has allowed us to design an FPSE-based extraction method to analyse the volatile compounds in aqueous samples. The optimized protocol followed for this purpose was as below:

<b>Etapa optimizada</b>	<b>Volumen</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Observaciones</b>
Cleaning	1ml	MeOH-AN 50:50	30'	Ultrasounds
Retention-Agitation	100ml	-	60'	900rpm
Extraction	1ml	MeOH 100%	10'	Ultrasounds

This method allowed for the extraction of several samples in parallel in a simple and fast way. The total estimated time for the extraction is 70 minutes, which is very positive. Besides, the results indicate a good yield in the extraction, being able to detect the desired compounds at concentrations of 50bbp in the aqueous mixture. Volatile compounds are usually examined using gas chromatography (GC); however, it is not advisable to inject aqueous samples in these GC systems. Thus, the method developed in this project is very useful, since it allows for the transfer of compounds from an aqueous solution to an organic solvent.

Performing the extraction with different fabrics (PEG, PDMS and PTHF) confirmed the importance of selecting a sorbent depending on the analytes that are going to be analysed. For the volatile compounds selected in this work, the PTHF and PEG were the most efficient fabrics for most of them.

Analysing beverage samples with this method was of great interest, since it was possible to identify compounds, such as fenchyl acetate or alpha terpineol, responsible for the aroma of those beverages.

Therefore, we can conclude that the fabrics technique is a reliable method when quantifying volatile compounds in waters and beverages; however, to know its concentration, a standard curve of such compounds is needed.

## 6. VALORACIÓN PERSONAL

En cuanto a las valoraciones, el trabajo me ha aportado la posibilidad de trabajar en un laboratorio de gran nivel como es el del departamento de química analítica del centro politécnico superior de la Universidad de Zaragoza. He tenido la oportunidad de trabajar con equipos exclusivos en la universidad y conocer de una forma tan cercana la cromatografía de gases.

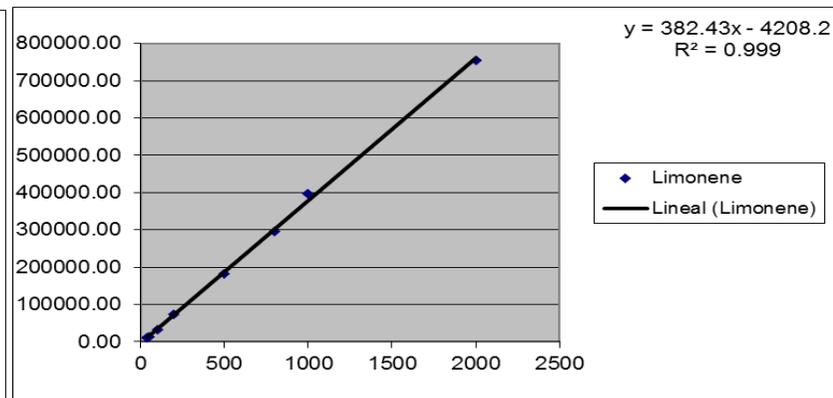
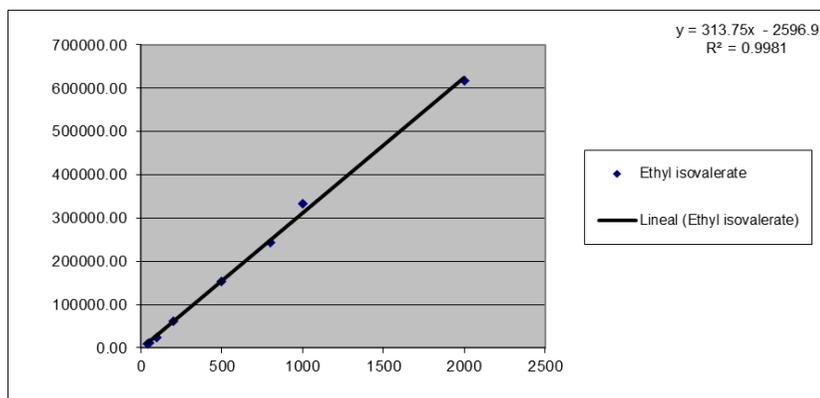
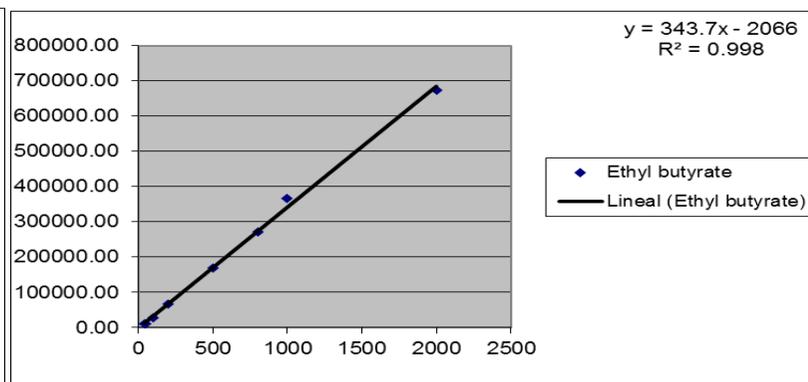
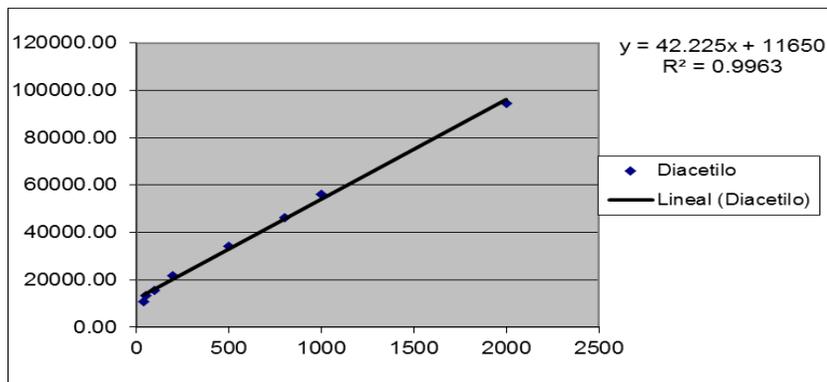
Quiero agradecer a Marga, Celia y todo el equipo de trabajo, el apoyo y las facilidades prestadas a la hora de elaborar mi proyecto, ya que en gran medida son parte de este trabajo.

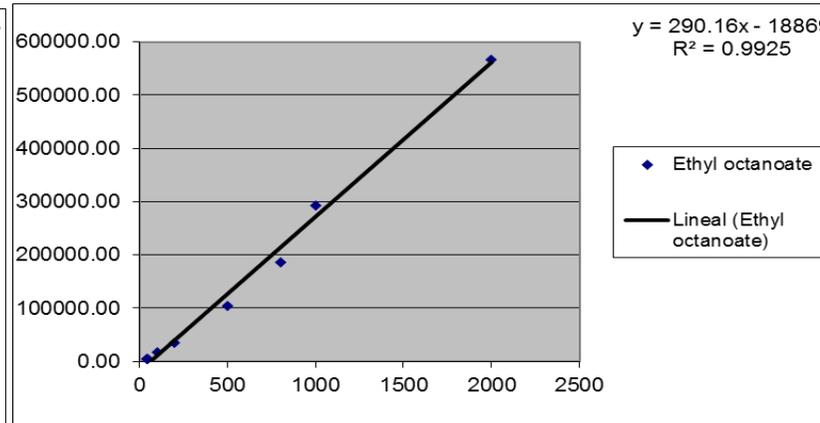
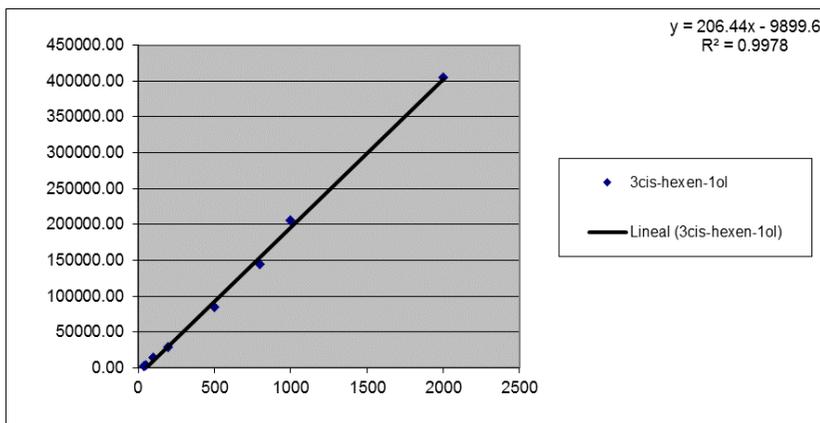
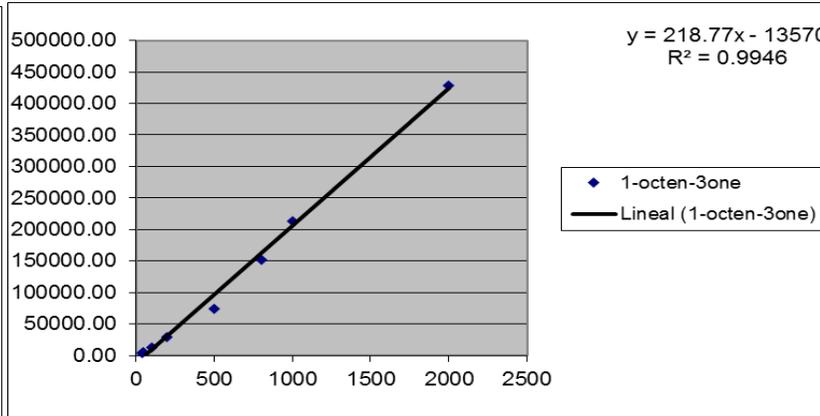
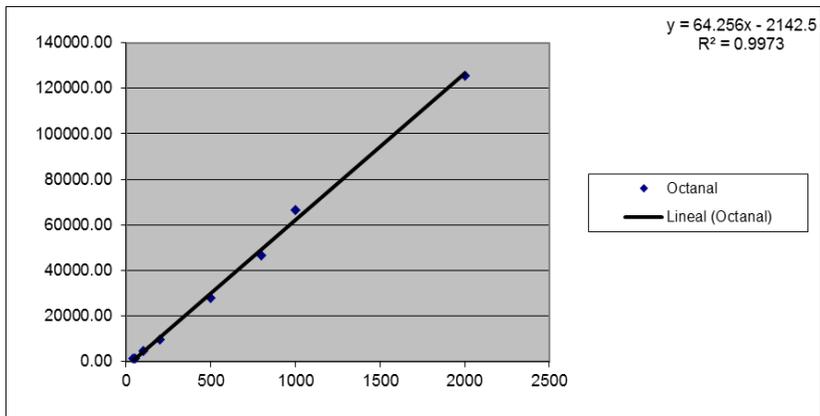
## BIBLIOGRAFÍA

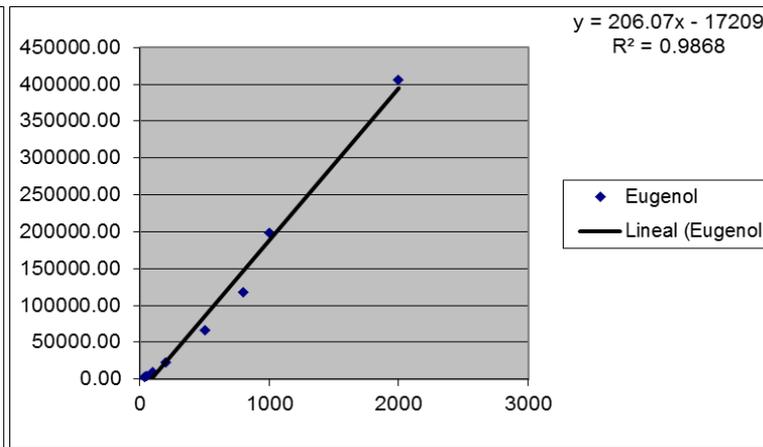
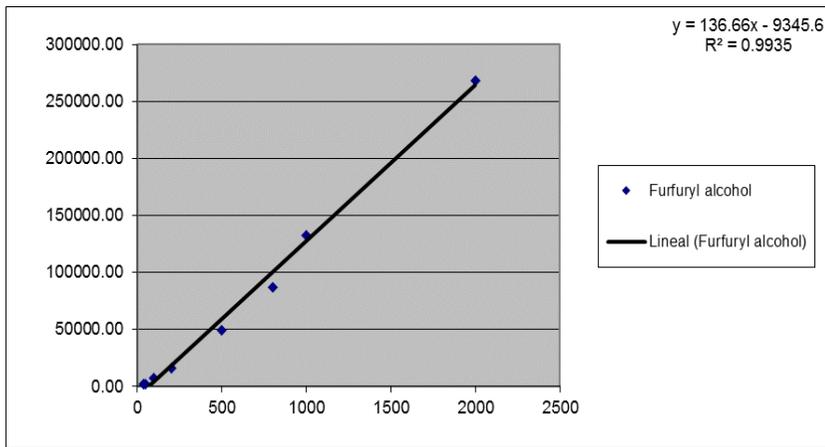
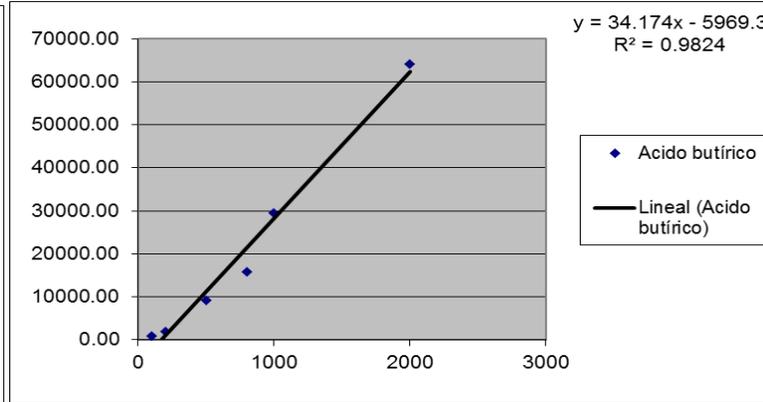
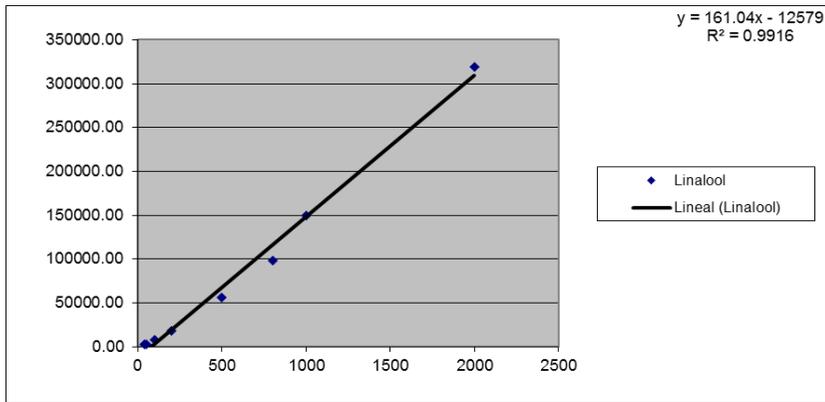
- Aznar, M., Alfaro, P., Nerin, C., & Kabir, A. (2015). *Fabric phase sorptive extraction (FPSE), a novel sample preparation methodology applied to the analysis of migration from plastic food packaging materials*. Zaragoza: Departamento de análisis químico, Universidad.
- Cacho Palomar, J. (2006). *La percepción de notas aromáticas del vino y el efecto de ciertas moléculas volátiles*. ACE: Revista de enología.
- Corral Payá, A. (2006). *Fundamentos y funciones de la espectrofotometría de masas*. Valencia: Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia.
- Cruz, V., Donaldo, E., Marquez, M., & Cardona, J. (2014). *Evaluación de los aceites esenciales (Alfa Pineno y Limonene) contra el crecimiento de Staphylococcus aureus productores de enterotoxinas in vitro*. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana.
- CSIC. (19 de Agosto de 2015). *Mncn*. Obtenido de Museo nacional de ciencias naturales: [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia\\_de\\_gases.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf)
- Gianelli Barra, M. P. (2005). *Interacción entre compuestos aromáticos del jamón curado y compuestos proteicos musculares solubles*. Universidad de Valencia.
- González Escobar, R. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol*.
- Jurado, A., García, A., Timón, M., & Carrapiso, I. (2009). *Maduración del jamón ibérico: evolución de índices basados en compuestos volátiles*. Cáceres: Facultad de Veterinaria.
- Kumar, G. H. (2014). Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Elsevier B.V.*
- Ramirez Ramirez, J. (2011). *Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. Nayarit: Centro de tecnología de alimentos.
- Raynal, C., Wardrop, F., Pillet, O., Heras, J. M., Dumont, A., & Ortiz-julien, A. (2010). *Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura no-Saccharomyces y de una levadura Saccharomyces cerevisiae, una herramienta innovadora para el enólogo*. Lallemand.
- Rodríguez Rivera, V. M., & Simón Magro, E. (2008). *Bases de la alimentación humana*. La Coruña: Netbiblo.
- The Good Scents Company. (08 de Septiembre de 2015). *The Good Scents Company*. Obtenido de <http://www.thegoodscentscompany.com/>

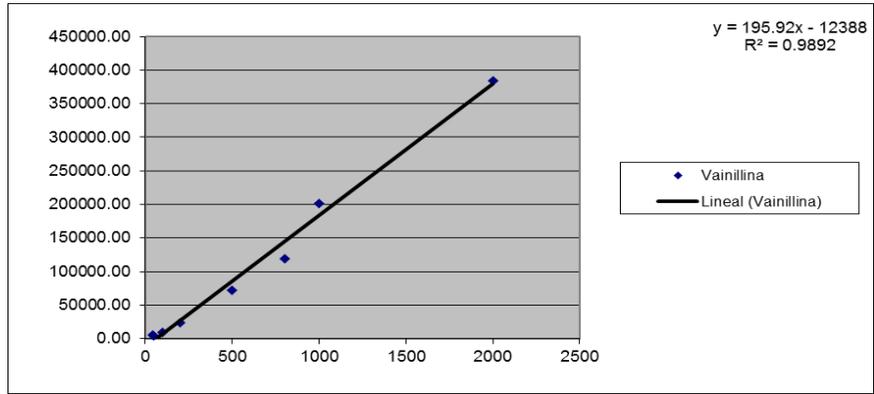
## ANEXO I

- Apéndice I: Rectas de calibrado de los compuestos (página 22, 4.1.3.)









- Apencice II: Tabla de datos de metanol vs acetoneitrilo (pag 23, 4.2.1.)

Metanol																
Compuesto	DIS	Blanco	M1	M1	M2	M2	M3	M3	Media	Concentración ppb	% Recuperación	ax	b	Concentración real	sd	rsd
Diacetilo	268	2969	1538	1654	2499	2607	3341	3654	1.00	0.00	-0.4	34978	47.25	351.96	857.6	85758.95
Ethyl butyrate	258	3964	59487	57689	71530	74235	91016	88754	69821.17	0.36	91.5	214500	-8211.1	397.62	14069.7	20.15
Ethyl isovalerate	259	6199	38319	39568	44083	43562	57040	59874	40875.33	0.23	53.5	665492	-109215	421.72	9137.1	22.35
Limonene	267	22	65165	68145	72693	71584	96404	95874	78288.83	0.26	82.6	261688	10730	312.46	14062.7	17.96
Octanal	263	703	33358	33665	34599	33986	38216	40789	35065.83	0.20	56.9	214500	-8211.1	354.84	3032.4	8.65
1-octen-3-one	266	584	78514	75456	85853	87569	100056	99568	87252.00	0.30	73.1	665492	-109215	403.76	10306.7	11.81
3cis-hexen-1ol	261	5904	53937	54687	56087	55879	62206	64123	51915.83	0.24	66.5	401874	-46052	366.76	4257.4	8.20
Ethyl octanoate	262	1701	107704	109256	116849	114795	132353	135478	117704.83	0.34	78.9	665492	-109215	432.38	11778.7	10.01
Linalool	265	209	54852	56712	55367	57412	63048	64574	58451.83	0.29	72.6	475524	-81014	403.78	4121.3	7.05
Acido butírico	269	8500	17045	17632	11056	13504	10260	11476	4995.50	0.18	50.2	269924	-43862	360.62	3168.8	63.43
Furfuryl alcohol	260	2043	39822	40210	38289	39654	44932	46789	39573.00	0.28	74.2	332058	-52667	374.60	3402.0	8.60
Eugenol	264	8724	103763	102546	96724	98547	113441	115736	96402.17	0.32	84.3	637934	-104770	374.28	7798.7	8.09
Vainillina	282	38745	106244	107413	86058	90523	105301	104687	61292.67	0.26	65.4	483502	-64025	396.22	9254.1	15.10

Acetonitrilo																
Compuesto	DIS	Blanco	M1	M1	M2	M2	M3	M3	Media	Concentración ppb	% Recuperación	ax	b	Concentración real	sd	rsd
Diacetilo	268	3	19226	18567	17492	18698	15861	16452	17713.00	0.39	109.7	39479	2470.8	351.96	1257.1	7.10
Ethyl butyrate	258	3	3	6	7	5	5	6	2.33	0.04	9.6	214500	-8211.1	397.62	1.5	65.00
Ethyl isovalerate	259	8	153	174	22508	26543	68	74	8245.33	0.18	41.9	665492	-109215	421.72	12668.9	153.65
Limonene	267	12	63540	62579	62763	63547	61074	63542	62828.83	0.20	63.7	261688	10730	312.46	1010.6	1.61
Octanal	263	13	26719	28754	28923	27458	31823	35647	29874.33	0.18	50.0	214500	-8211.1	354.84	1056.7	3.54
1-octen-3-one	266	217	71055	69854	75087	73654	79259	80541	74691.33	0.28	68.4	665492	-109215	403.76	2386.3	3.19
3cis-hexen-1ol	261	245	43038	45692	47022	48574	48449	50623	46988.00	0.23	63.1	401874	-46052	366.76	2291.1	4.88
Ethyl octanoate	262	283	91021	93623	100414	98563	108586	110742	100208.50	0.31	72.8	665492	-109215	432.38	6225.5	6.21
Linalool	265	14	46958	49623	50292	49657	52162	55471	50679.83	0.28	68.6	475524	-81014	403.78	1482.0	2.92
Acido butírico	269	388	11911	9874	15431	12547	12041	11456	11822.00	0.21	57.2	269924	-43862	360.62	2296.5	19.43
Furfuryl alcohol	260	10	38423	39214	41481	42579	40074	43687	40899.67	0.28	75.2	332058	-52667	374.60	1934.7	4.73
Eugenol	264	999	90756	92654	102627	100471	95531	98245	95715.00	0.31	84.0	637934	-104770	374.28	5803.2	6.06
Vainillina	282	2592	87235	88654	92010	85476	82236	80541	83433.33	0.30	77.0	483502	-64025	396.22	2452.1	2.94

- Apéndice III: optimización de la extracción (pag. 24, 4.2.2.)

15 ml														
Compuesto	DIS	15 min	30 min	60 min	Concentración ppb	Factor concentración	Concentración ppb	Factor concentración	Concentración ppb	Factor concentración	ax	b	Concentración real	
Diacetilo	268	808	918	931.666667	0.02	0.12	0.02	0.14	0.03	0.14	34978	47.25	175.98	
Ethyl butyrate	258	110734.5	109504.5	98126	0.20	0.99	0.19	0.97	0.15	0.77	286178	54306	198.81	
Ethyl isovalerate	259	219396.5	227268	251609.667	0.68	3.24	0.72	3.40	0.83	3.92	224418	66281	210.86	
Limonene	267	64707.5	51266	46424	0.21	1.32	0.15	0.99	0.14	0.87	261688	10730	156.23	
Octanal	263	32531.5	38087	39519	0.19	1.07	0.22	1.22	0.22	1.25	214500	-8211.1	177.42	
1-octen-3-one	266	102568	117337	120568.667	0.32	1.58	0.34	1.69	0.35	1.71	665492	-109215	201.88	
3cis-hexen-1-ol	261	15038.5	17275.5	17742.6667	0.15	0.83	0.16	0.86	0.16	0.87	401874	-46052	183.38	
Ethyl octanoate	262	199148	215656	205891.333	0.46	2.14	0.49	2.26	0.47	2.19	665492	-109215	216.19	
Linalool	265	66189.5	80419	99211.6667	0.31	1.53	0.34	1.68	0.38	1.88	475524	-81014	201.89	
Acido butírico	269	353.5	44708	42964.6667	0.16	0.91	0.33	1.82	0.32	1.78	269924	-43862	180.31	
Furfuryl alcohol	260	622	734.5	914	0.16	0.86	0.16	0.86	0.16	0.86	332058	-52667	187.30	
Eugenol	264	48259.5	52674.5	58840.6667	0.24	1.28	0.25	1.32	0.26	1.37	637934	-104770	187.14	
Vainillina	282	51.5	50	10.3333333	-1.15	-5.80	-1.15	-5.80	-1.15	-5.80	121552	139752	198.11	
						1.32		1.43		1.47				
50 ml														
Compuesto	DIS	15	30	60	Concentración ppb	Factor concentración	Concentración ppb	Factor concentración	Concentración ppb	Factor concentración	ax	b	Concentración real	
Diacetilo	268	11212.6667	11094.3333	11197.3333	0.32	1.81	0.32	1.79	0.32	1.81	34978	47.25	175.98	
Ethyl butyrate	258	72503.6667	89204.6667	109109	0.06	0.32	0.12	0.61	0.19	0.96	286178	54306	198.81	
Ethyl isovalerate	259	140578	184186	273414	0.33	1.57	0.53	2.49	0.92	4.38	224418	66281	210.86	
Limonene	267	32112.6667	52252.6667	45884	0.08	0.52	0.16	1.02	0.13	0.86	261688	10730	156.23	
Octanal	263	25383.3333	40354.3333	56668	0.16	0.88	0.23	1.28	0.30	1.70	214500	-8211.1	177.42	
1-octen-3-one	266	77697.6667	95141	144206	0.28	1.39	0.31	1.52	0.38	1.89	665492	-109215	201.88	
3cis-hexen-1-ol	261	7703.66667	17568	24727	0.13	0.73	0.16	0.86	0.18	0.96	401874	-46052	183.38	
Ethyl octanoate	262	165175.333	253749.667	390086.333	0.41	1.91	0.55	2.52	0.75	3.47	665492	-109215	216.19	
Linalool	265	59102	75603	122828.333	0.29	1.46	0.33	1.63	0.43	2.12	475524	-81014	201.89	
Acido butírico	269	34434.3333	53633.6667	81999.6667	0.29	1.61	0.36	2.00	0.47	2.59	269924	-43862	180.31	
Furfuryl alcohol	260	574.333333	742	1066	0.16	0.86	0.16	0.86	0.16	0.86	332058	-52667	187.30	
Eugenol	264	50882.3333	62185.3333	83695.3333	0.24	1.30	0.26	1.40	0.30	1.58	637934	-104770	187.14	
Vainillina	282	16	23	13.3333333	-1.15	-5.80	-1.15	-5.80	-1.15	-5.80	121552	139752	198.11	
						1.20		1.50		1.93				
100 ml														
Compuesto	DIS	15	30	60	Concentración ppb	Factor concentración	Concentración ppb	Factor concentración	Concentración ppb	Factor concentración	ax	b	Concentración real	
Diacetilo	268	10655	17848.6667	17264.3333	0.30	1.72	0.51	2.89	0.49	2.80	34978	47.25	175.98	
Ethyl butyrate	258	107877	146679.667	119338	0.19	0.94	0.32	1.62	0.23	1.14	286178	54306	198.81	
Ethyl isovalerate	259	257681	459586.333	483325	0.85	4.04	1.75	8.31	1.86	8.81	224418	66281	210.86	
Limonene	267	71700	167455	122488	0.23	1.49	0.60	3.83	0.43	2.73	261688	10730	156.23	
Octanal	263	36279	70969	112835.333	0.21	1.17	0.37	2.08	0.56	3.18	214500	-8211.1	177.42	
1-octen-3-one	266	105716	226398.667	273061.667	0.32	1.60	0.50	2.50	0.57	2.85	665492	-109215	201.88	
3cis-hexen-1-ol	261	16303	34333	52980	0.16	0.85	0.20	1.09	0.25	1.34	401874	-46052	183.38	
Ethyl octanoate	262	245423	610490	1030860.33	0.53	2.46	1.08	5.00	1.71	7.92	665492	-109215	216.19	
Linalool	265	54857	123246.333	204807.667	0.37	1.81	0.62	3.07	0.92	4.56	269924	-43862	201.89	
Acido butírico	269	52322	132592	224025.667	0.36	1.98	0.80	4.43	1.79	9.93	92280	58810	180.31	
Furfuryl alcohol	260	591	1761	1832.33333	0.16	0.86	0.16	0.88	0.16	0.88	332058	-52667	187.30	
Eugenol	264	28377	61451.3333	85911	0.21	1.12	0.26	1.39	0.30	1.60	637934	-104770	187.14	
Vainillina	282	16	12782.6667	7325.33333	-1.15	-5.80	-1.04	-5.27	-1.09	-5.50	121552	139752	198.11	
						1.67		3.09		3.98				