

ESTUDIOS CENTRADOS EN LA TÉCNICA  
CROMATOGRFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA.  
AVANCES EN LA METODOLOGÍA E  
INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS  
SENSORIALES

TRABAJO FIN DE GRADO

Dirección: Ana Escudero Carra

Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE)

**PAOLA LOLUMO REMIRO**

Septiembre 2022

## **RESUMEN**

En este trabajo de fin de grado se ha caracterizado una muestra de vino utilizando diferentes metodologías para el análisis de compuestos mayoritarios y trazas responsables del aroma del vino. La técnica cromatográfica utilizada ha sido la cromatografía de gases (GC) y se han usado 3 técnicas de obtención de extractos diferentes: microextracción líquido-líquido, extracción en fase sólida (SPE) y espacio de cabeza dinámico-extracción en fase sólida (HSD-SPE). Con los dos extractos primeros, obtenidos directamente desde el vino, se han cuantificado 67 compuestos. Sin embargo, utilizando la técnica HSD-SPE se identifica un número menor de compuestos (32), pero es el usado para la jerarquización de odorantes mediante olfatometría por ser el extracto más representativo sensorialmente del producto inicial. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la metodología HSD-SPE, se han monitorizado las curvas de ruptura de algunos compuestos mediante GC-MS utilizando cartuchos de resinas en tándem. Dependiendo del tipo de compuesto el sistema admite un volumen mayor o menor de muestra (espacio de cabeza del vino) antes de saturarse el cartucho de resina Isolute ENV+ y perder analito. Los ácidos lineales ya en la primera hora de purga superan el volumen de ruptura de los 400mg de resina. Espacio de cabeza con compuestos polares y pequeños como isovalerato de etilo, acetato de butilo e isobutanol puede ser adsorbido en el cartucho entre 3 y 5 horas sin saturarse. Sin embargo, compuestos más apolares, incluso después de 9 horas de purga, no sufren pérdidas en el sistema usado, por lo que puede aumentarse la sensibilidad de este borboteando más vino que el estándar (80ml) o purgando durante más tiempo que el estándar (100min) para poder determinar compuestos importantes sensorialmente que estén en concentraciones muy bajas.

## **ABSTRACT**

In this final degree thesis a wine sample has been characterized using different methodologies for the analysis of major and trace compounds responsible for wine aroma. The chromatographic technique used was gas chromatography (GC) and three different techniques were used to obtain extracts: liquid-liquid microextraction, solid phase extraction (SPE) and dynamic headspace-solid phase extraction (HSD-SPE). With

the first two extracts, obtained directly from wine, 67 compounds were quantified. However, using the DHS-SPE technique, a smaller number of compounds (32) were identified, but it is the one used for the ranking of odorants by olfactometry because it is the most sensorially representative extract of the initial product. In order to increase the sensitivity of the HSD-SPE methodology, the breakdown curves of some compounds have been monitored by GC-MS using tandem resin cartridges. Depending on the type of compound the system admits a larger or smaller volume of sample (wine headspace) before saturating the Isolute ENV+ resin cartridge and losing analyte. Linear acids already in the first hour of purging exceed the 400mg resin breakthrough volume. Headspace with polar and small compounds such as ethyl isovalerate, butyl acetate and isobutanol can be adsorbed on the cartridge within 3 to 5 hours without saturating. However, more apolar compounds, even after 9 hours of purging, do not suffer losses in the system used, so the sensitivity of the system can be increased by bubbling more wine than the standard (80ml) or purging longer than the standard (100min) in order to determine sensory important compounds that are at very low concentrations.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>4</b>
<b>3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Muestras .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Reactivos, disoluciones y materiales.....</b>	<b>4</b>
<b>3.3 Caracterización aromática inicial de la muestra .....</b>	<b>5</b>
3.3.1 Análisis de compuestos volátiles mayoritarios.....	5
3.3.2 Análisis de compuestos volátiles minoritarios .....	7
<b>3.4 Perfil de volatilización de los aromas del vino y curvas de ruptura del sistema SPE .....</b>	<b>8</b>
3.4.1 Preparación de los cartuchos y obtención de los extractos espacio de cabeza (HS)-extracción en fase sólida (SPE) .....	9
3.4.2 Análisis GC-MS.....	10
<b>3.5 Tratamiento de datos .....</b>	<b>10</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Caracterización aromática inicial del vino .....</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Cromatogramas obtenidos de los análisis HSD-SPE.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Perfil de volatilización del vino y curvas de ruptura de compuestos volátiles</b>	<b>16</b>
<b>4.4 Discusión.....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>24</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>25</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

Estudiar el aroma del vino implica conocer las moléculas volátiles odorantes capaces de interactuar con los receptores olfativos provocando un estímulo. En términos cuantitativos, estos compuestos, comúnmente denominados odorantes impacto, representan una fracción muy pequeña del producto total<sup>1</sup>.

Una forma sencilla de conocer la importancia olfativa de las sustancias volátiles es comparar la concentración de estas con el umbral de olfacción. Cuanto mayor es esta relación, en principio, la aportación al aroma del producto es mayor.

Según un reciente *review* publicado por Ferreira el número de compuestos que en un tipo de vino u otro pueden estar presentes en concentración superior a su valor umbral se acerca a 65 (de los cerca de 1000 descritos como presentes en la fracción volátil)<sup>6</sup>.

Los odorantes impacto, se pueden asociar en familias que, en grupo, proporcionan al vino un aroma característico sin necesidad de superar sus valores umbral. Muchos fenoles volátiles, lactonas y algunos terpenos pertenecen a este grupo<sup>7</sup>. Sin embargo, se ha demostrado que existen odorantes en concentraciones que superan el umbral y que presentan un carácter muy personal. Por ejemplo, de todos los ésteres afrutados del vino, se ha descubierto que solo el acetato de isoamilo y el acetato de feniletilo pueden actuar como odorantes impacto<sup>2</sup>.

La técnica más adecuada para jerarquizar estos compuestos volátiles responsables del aroma es la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O). Esta técnica engloba la cromatografía de gases como método de separación y la nariz humana como detector, a menudo, más sensible que la mayoría de los detectores instrumentales<sup>4</sup>. Para esta técnica, en el GC debe inyectarse un extracto representativo del aroma del vino o producto a estudiar.

En GC-O, el primer paso es la obtención del extracto que refleje lo mejor posible la composición química del espacio de cabeza del vino. El extracto debe ser representativo

del olor que se percibe. Es decir, debe tener los compuestos y en las proporciones similares a las que se encuentran en las fosas nasales durante el consumo del vino.

La mayoría de las técnicas de preparación de extractos se basan en la transferencia directa de los componentes del vino a un disolvente (extracción líquido-líquido<sup>12</sup>) o a un sorbente de resinas (extracción en fase sólida (SPE<sup>13</sup>)).

Pero el disolvente utilizado normalmente en la extracción líquido-líquido (diclorometano) extrae componentes no volátiles, lo que complica la representatividad de los extractos. El uso de resinas permite recuperar de un modo no selectivo los odorantes del vino con una pequeña cantidad de sorbente, lo que disminuye el volumen de disolvente necesario para la elución y, por tanto, la etapa de evaporación<sup>7</sup>. Esto constituye una gran ventaja para la extracción en fase sólida (SPE) con respecto a la extracción líquido-líquido. Otra ventaja de la SPE es que no existe la formación de emulsiones.

La técnica utilizada para la obtención de los extractos en la parte principal de este trabajo se basa en el espacio de cabeza dinámico (DHS-SPE) unido a una extracción en fase sólida. Consiste en la purga de la muestra con un gas inerte, simulando las condiciones que se dan en la boca durante la ingestión del producto. Conforme se van desprendiendo los volátiles de la matriz, la corriente de flujo de gas los conduce hasta el cartucho que está acoplado al espacio de cabeza. El cartucho de extracción en fase sólida (SPE) contiene un sorbente, una resina polimérica, en el cual se quedan retenidos los volátiles.<sup>[4,5]</sup> Concretamente se usa resina Isolute ENV+ con una alta superficie específica (tamaño de partícula 40micras, tamaño de poro 800 ángstroms y área superficial 1000m<sup>2</sup>/g).

Los compuestos responsables del aroma del vino tienen en común que son moléculas volátiles. Sin embargo, difieren en propiedades químicas como la polaridad. Esto hace que unos compuestos se retengan más y otros menos dependiendo de la naturaleza química tanto de la resina empleada como de ellos mismos. En este trabajo usamos resina Isolute ENV+, absorbente polimérico con una superficie hidroxilada, capaz de extraer una amplia gama de analitos polares solubles en agua de muestras acuosas. Algunos de los compuestos del aroma son bastante hidrofóbicos y se liberan muy

fácilmente de la matriz del vino, mientras que otros son bastante hidrofílicos y se liberarán con dificultad<sup>2</sup>. Es decir, los compuestos menos polares serán los principales constituyentes del espacio de cabeza del vino por lo que pasarán y se retendrán en la resina más fácilmente que los más polares.

La dificultad para analizar compuestos aromáticos depende, como se ha comentado, de las características químicas (sobre todo polaridad) pero también de la concentración y la calidad de su espectro de masas si se usa la espectrometría de masas como detector del GC. Se buscan las técnicas lo más sensibles posible para analizar compuestos que presentan dificultades, por ejemplo, los muy diluidos ( $\mu\text{g/L}$ - $\text{ng/L}$ ).

Para trabajar con un sistema HSD-SPE lo más sensible posible es necesario conocer el volumen de ruptura de cada cartucho de extracción en fase sólida. El volumen de ruptura es el volumen de aire que puede pasarse a través de un cartucho antes de que la concentración en el aire eluyente alcance un determinado porcentaje de la de entrada. Este porcentaje suele ser el 5%. Es decir, se considera el volumen a partir del cual se pierde más de 5% del compuesto a determinar. La naturaleza química de los compuestos y de la resina es principalmente lo que determina este volumen de ruptura.

El presente trabajo, se centra en monitorizar las curvas de ruptura de los analitos volátiles identificados en un vino, con el fin de aumentar la sensibilidad en el protocolo utilizado en estos momentos por el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE) en la obtención de extractos usados en olfatometría. Para ello, se debe determinar el volumen de ruptura de cada compuesto en los cartuchos utilizados para conocer cuántos mililitros de espacio de cabeza de la muestra son retenidos sin haber pérdidas significativas.

## 2. OBJETIVO

El objetivo a largo plazo es aumentar la sensibilidad de la metodología (DHS-SPE) usada hasta ahora en la obtención de extractos para olfatometría, representativos sensorialmente del vino inicial.

Otros objetivos específicos son:

- Conocer las curvas de ruptura del sistema de extracción en fase sólida (SPE) aplicado a un espacio de cabeza dinámico (DHS) .
- Conocer el perfil de volatilización de los componentes aromáticos de un vino aplicando los conocimientos adquiridos en el grado.

## 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 3.1 Muestras

Las muestras fueron 3 botellas de vino tinto joven BORSAO procedente de la denominación de Origen Campo de Borja. Dichas botellas se mezclaron para partir de exactamente la misma muestra a lo largo de todo el experimento.

### 3.2 Reactivos, disoluciones y materiales

- Cartuchos de filtración de 1 mL y de 3 mL
- Frits de polietileno para cartuchos de 3 mL
- Resinas Isolute ENV+ (Biotage): 400 mg en cada cartucho para HSD-SPE
- Diclorometano (Fisher Scientific, UK, 99,8%)
- Metanol (Fisher Scientific, UK, 99,9%)
- Etanol (Fisher Scientific, UK)
- Disolución "SI mayor": disolución de estándares internos para análisis de volátiles mayoritarios compuesta por 4-metil-2-pentanol, heptanoato de etilo, 2-octanol y ácido heptanoico con una concentración de cada uno de los compuestos de 1500-2000 mgL<sup>-1</sup> en etanol.
- Disolución "SI trazas": disolución de estándares internos para análisis de volátiles trazas compuesta por 3-octanona, 2-octanol y 3,4-dimetilfenol con una concentración de cada uno de los compuestos de unos 4 mgL<sup>-1</sup> en etanol.



-Disolución de estándares internos para analizar el espacio de cabeza: se preparan 10 ml de una disolución compuesta por 6,0 mgL<sup>-1</sup> de 3,4-dimetilfenol, 19,7 mgL<sup>-1</sup> de 2-octanol y 16,9 mgL<sup>-1</sup> de heptanoato de etilo en etanol.

-Agua-40% etanol.

-Agua-12% etanol.

-Sulfato Amónico (ACS-ISO, Panreac).

-Agua-30% metanol conteniendo un 1% en peso de NaHCO<sub>3</sub>.

- Diclorometano-5% metanol.

-N<sub>2</sub> (Nitrógeno 5.0, Linde)

-Vasos de precipitados, matraces aforados, pipetas Pasteur, pipetas de vidrio, reservorios, viales de inserto de 2 mL.

-Agitador Heidolph Promax 1020

-Centrífuga J.P Selecta

- Bomba de vacío acoplada a sistema de SPE semiautomático (VAC Elut 20, Varian).

### 3.3 Caracterización aromática inicial de la muestra

La muestra fue previamente analizada y caracterizada aromáticamente siguiendo dos protocolos del Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología por duplicado:

- Análisis de compuestos volátiles mayoritarios<sup>12</sup>.
- Análisis de compuestos volátiles minoritarios (trazas)<sup>13</sup>.

Ambos protocolos constan de unos reactivos y disolventes específicos, así como de una metodología con su correspondiente calibración y control interno de calidad. Los extractos de mayoritarios se analizan mediante GC-FID y los extracto de minoritarios se analizan mediante GC-MS. Ambos protocolos constituyen una modificación de las citas 12 y 13, respectivamente, de la bibliografía.

#### 3.3.1 Análisis de compuestos volátiles mayoritarios

El análisis de volátiles mayoritarios se basa en una microextracción líquido-líquido de vino con una pequeña cantidad de disolvente (diclorometano) y posterior análisis por GC-FID del extracto. Se trabaja con una disolución de 4 estándares internos (apartado 3.2). Tras el análisis, se calculan las áreas relativas al estándar interno específico y se les aplica el factor de respuesta correspondiente a cada analito para obtener su concentración.

Para llevar a cabo el proceso, en primer lugar, se vierte el vino en un matraz de 5ml de capacidad, hasta aproximadamente la mitad. A este matraz, se adicionan 38  $\mu\text{L}$  de la disolución "SI mayor" haciendo uso de una microjeringa de 100  $\mu\text{L}$ . Finalmente, se enrasa el matraz con vino con la ayuda de una pipeta Pasteur y se limpia la microjeringa empleada un mínimo de 5 veces con una disolución agua/etanol al 40% v/v.

En segundo lugar, se pesa 4,1g de sulfato amónico en un granatorio y se vierte en un tubo de fondo cónico. A su vez, se trasvasa el vino del matraz preparado con anterioridad a un vaso de precipitados de 25 mL y de ahí se toman con una pipeta 2,7 mL que se vierten en el tubo que contiene el sulfato amónico. Se añaden a este mismo tubo 6,3 mL de agua MilliQ y 250  $\mu\text{L}$  de diclorometano.

A continuación, el tubo se agita en el agitador horizontal Heidolph Promax 1020 durante 90 minutos a 90 r.p.m y pasado este tiempo se centrifuga durante 10 minutos a 2500 r.p.m en la centrífuga J.P.Selecta. Con una pipeta de plástico se retira la fase acuosa situada en la parte superior del tubo y con una microjeringa, se recoge la fase orgánica situada en la parte inferior del tubo.

Finalmente, se trasvasa el extracto a un vial de 2mL con inserto y septum para su posterior inyección y análisis por GC-FID.

Las condiciones de inyección y cromatografía fueron:

-Jeringa Hamilton: Volumen 10  $\mu\text{L}$  con aguja viselada.

-Liner tipo Split/splitless de 3,45 mm diámetro interno con carbofrit, colocado a una distancia de 3,3 cm desde la parte superior del liner.

-Volumen inyectado: 2  $\mu\text{L}$

-Tª inyección: 250 °C (mantenida 83 min)

-Modo inyección: Split 1/20

-Inyector: Los extractos se inyectan con un automuestreador CP-8400 de Varian en un inyector modelo 1079 de Varian.

-Pulso de presión: 20 psi. 2,50 min

-Cromatógrafo de gases: modelo GC-3800 de Varian (Walnut Creek, CA, USA) acoplado a un detector de ionización a la llama, FID. La temperatura del detector FID es de 250°C.

-El gas portador es Helio con un caudal de 2,2 ml min<sup>-1</sup>.

-Columna capilar para GC: Zebron<sup>TBM</sup> ZB-WAX, 30 m x 0,32 mm d.i x 0,50 µm de espesor de fase, Phenomenex, Inc. La columna está precedida por una precolumna desactivada de 3 m x 0,32 nm. de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

El programa de temperaturas de la columna fue el siguiente:

Temperatura (°C)	Rampa (°Cmin <sup>-1</sup> )	Tiempo (min)
40		3
62	8	0
90	2	0
98	8	0
124	2	0
230	8	5

Tabla 1. Programa de temperaturas de la columna.

### 3.3.2 Análisis de compuestos volátiles minoritarios

El análisis de volátiles trazas se basa en una extracción en fase sólida (SPE) y posterior análisis por GC-MS del extracto. Se trabaja con la disolución descrita en el apartado 3.2 como "SI trazas". A través de los datos de áreas relativas y los factores de respuesta obtenidos en vino sintético se obtienen los niveles de concentración.

Para llevar a cabo este tipo de análisis, en primer lugar, se preparan los cartuchos con 70 mg de resinas ISOLUTE ENV+ y se acondicionan a través del paso de 2mL de diclorometano, 2 mL de metanol y otros 2 mL de disolución hidroalcohólica ajustada al 12% de etanol.

A continuación, se trasvasan unos 7 mL de vino a un matraz aforado de 15 mL. A este matraz se adicionan 100 µL de la disolución "SI trazas" empleando una microjeringa. A continuación, se enrasa el matraz con el vino.

El contenido de este matraz se trasvasa al reservorio situado con el cartucho de resinas y se hace pasar 15 mL de muestra de vino a una velocidad de 2 mLmin<sup>-1</sup> con la ayuda del sistema de vacío. Posteriormente se lava el cartucho con 1,5 mL de disolución agua/metanol al 30% v/v conteniendo un 1% en peso de NaHCO<sub>3</sub> y se secan los cartuchos empleando vacío para eliminar la posible presencia de agua en las resinas.

Finalmente, se eluye con 800 µL de diclorometano-5% metanol. La elución debe llevarse a cabo gota a gota y el eluato se recoge en viales para su posterior inyección en el GC-MS.

Las condiciones cromatográficas y de inyección fueron las siguientes:

-Cromatógrafo de gases: modelo GC-450 de Varian (Walnut Creek, CA, USA), acoplado a un detector de masas ion-trap Varian Saturn 2200.

-Columna capilar: DB-WAX UI de Agilent de 60 m x 0,25 mm d.i. x 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase. La columna está precedida por una precolumna desactivada de 3 m x 0,32 mm d.e. de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

-El gas portador es Helio con un caudal de 1,5 ml/min.

-El programa de temperaturas del horno es el siguiente.

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rampa ( $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ )	Tiempo espera (min)
35		3
220	2	0
240	20	30

Tabla 2. Programa de temperaturas del horno.

-El intervalo de masas adquirido fue 35-220 m/z.

-Volumen de inyección: 2  $\mu\text{L}$

-Tipo de inyección: se trabaja en modo splitless cerrado (tiempo de splitless: 2,20 min) y luego splitless abierto (Split 1/20) de 2,2-5,0 min.

-Pulso de presión: se inyecta con un pulso de 30 psi. (2,18 min)

-Programa de inyección: se hace en frío, siguiendo estas etapas:

1. Inicio a 40  $^{\circ}\text{C}$  durante 0,05 minutos.
2. A continuación se sube con una rampa de 200  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  hasta 300  $^{\circ}\text{C}$  y se mantiene 50 minutos.

### 3.4 Perfil de volatilización de los aromas del vino y curvas de ruptura del sistema SPE

Para hacer el seguimiento de la composición del espacio de cabeza del vino y conocer la cantidad de volátiles que pueden retener 400mg de resinas Isolute ENV+, se ha usado el dispositivo que aparece en la Imagen 1 con 80mL de vino y 2 cartuchos en tándem. Estos cartuchos los denominaremos: cartucho madre el más próximo al dispositivo y cartucho hijo 1 (con la numeración consecutiva correspondiente) el colocado después del anterior.

Las condiciones del espacio de cabeza son temperatura ambiente y una corriente de nitrógeno con un flujo controlado de 500 mL/min durante 60 min. En el método estándar usado para GC-O se pasa ese mismo flujo durante 100 minutos con un solo cartucho de resina y sin cambiar los 80ml de vino.

En este trabajo, pasada 1 hora, se retiran los dos cartuchos con resina y el vino utilizado y se añaden al recipiente 80 mL de vino nuevo. Se vuelve a colocar el cartucho madre en la salida y el cartucho 2 recién acondicionado encima. Se comprueba que el flujo de nitrógeno sea correcto y se deja el montaje otros 60 min.

Este proceso se repite 9 veces siempre con el mismo cartucho madre y cambiando cada vez los 80 ml de vino y el cartucho hijo. De esta manera, al cabo de 9 horas se retira el último cartucho etiquetado como 9 y con él, el cartucho madre.

Todo este proceso se ha repetido 3 veces.

#### 3.4.1 Preparación de los cartuchos y obtención de los extractos espacio de cabeza (HS)-extracción en fase sólida (SPE)

Para cada una de las 3 réplicas, se preparan 10 cartuchos de 3 ml de capacidad y 400 mg de resina Isolute ENV+ y se etiquetan, uno como “madre”, y el resto numerados del 1 al 9.

A continuación, se acondicionan dichos cartuchos, percolando por cada uno 20 ml de diclorometano y dejándolos secar a vacío.

En primer lugar, se coloca el cartucho etiquetado como “madre” en la salida correspondiente del recipiente de vidrio dónde se encuentran 80 ml de vino y a su vez, se coloca encima el cartucho etiquetado como 1 (ver Imagen1). Tras purgar 60 minutos con N<sub>2</sub> se retira el vino y el cartucho hijo. Se repite 9 veces.

Los cartuchos retirados se secan utilizando una purga de nitrógeno durante 10 minutos, para eliminar el agua retenida en la resina.

A continuación, los cartuchos se eluyen con 3,2 ml de diclorometano-5%metanol y se recogen los extractos obtenidos en distintos viales.

A estos viales, se añaden 100 µL de la disolución preparada con 3 estándares internos (2-octanol, 3,4-dimetilfenol y heptanoato de etilo).

Los compuestos a analizar se encuentran en concentraciones pequeñas por lo que es necesario concentrar los extractos hasta 200 µl usando corriente de N<sub>2</sub>. Para ello, se traspasa poco a poco el volumen de cada vial a la parte inferior de un Kuderna-Danish

(Imagen 2) y se aplica una leve corriente de nitrógeno sobre la superficie del extracto. Durante este proceso hay que ir homogeneizando el extracto con la ayuda de una pipeta Pasteur. Una vez alcanzados los 200  $\mu\text{l}$  se conservan los extractos en sus respectivos viales y se guardan en el congelador para evitar pérdidas hasta su posterior inyección en el cromatógrafo.

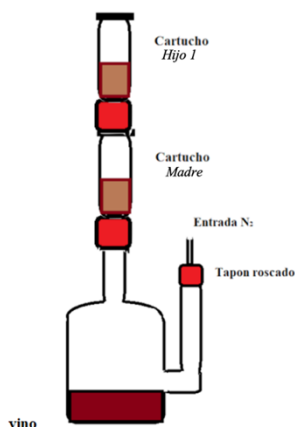


Imagen 2. Dispositivo para la extracción HSD-SPE



Imagen 1. Concentrador Kuderna-Danish.

### 3.4.2 Análisis GC-MS

Los análisis se realizan en un cromatógrafo Varian GC-450 acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas de trampa iónica Saturn 2200, Varian. El equipo y las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las usadas en el análisis de compuestos volátiles minoritarios (apartado 3.3.2)

Cada vial se inyectó 2 veces: una en modo Split (flujo 1/20) y otra en modo Splitless al igual que el análisis de trazas. El intervalo de masas adquirido fue 35-220 m/z. La adquisición de la señal comienza en el minuto 10 en modo Split y 11,5 en modo Splitless y se alarga en ambos casos hasta el minuto 125. Antes de inyectar los extractos correspondientes, se inyecta una disolución blanco de diclorometano para comprobar la limpieza del sistema.

### 3.5 Tratamiento de datos

En los 60 cromatogramas procedentes del sistema HSD-SPE se identifican los compuestos utilizando sus respectivos tiempos de retención y masas selectivas. La siguiente tabla muestra los tiempos de retención ( $T_r$ ) de cada analito, sus masas selectivas, así como el estándar interno utilizado y el tipo del cromatograma del que se ha obtenido la información (con inyección split o splitless).

<b>Compuestos</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>Masas selectivas</b>	<b>Estándar Interno</b>	<b>Inyección del cromatograma</b>
<i>Acetato de isobutilo</i>	13,6	43,0	2-Octanol	Split
<i>Butirato de etilo</i>	14,4	43,0+71,0+88,0	2-Octanol	Splitless
<i>2-metilbutirato de etilo</i>	15,0	102,0	2-Octanol	Splitless
<i>Isovalerato de etilo</i>	15,4	57,0	2-Octanol	Splitless
<i>Acetato de butilo</i>	15,7	56,0+61,0	2-Octanol	Splitless
<i>Isobutanol</i>	15,8	41,0+42,0	2-Octanol	Split
<i>Acetato de isoamilo</i>	17,4	55,0+70,0+87,0	2-Octanol	Split
<i>1-Butanol</i>	19,7	41,0+56,0	2-Octanol	Splitless
<i>Hexanoato de etilo</i>	24,9	42,0+88,0+99,0	Heptanoato de etilo	Splitless
<i>Acetato de hexilo</i>	27,2	43,0+56,0+69,0	2-Octanol	Splitless
<i>Acetoina</i>	27,4	43,0+45,0+88,0	2-Octanol	Splitless
<i>Lactato de etilo</i>	31,6	45,0+75,0	2-Octanol	Splitless
<i>1-Hexanol</i>	32,6	55,0+56,0+69,0	2-Octanol	Splitless
<i>z-3-hexenol</i>	33,1	67,0+40,0	2-Octanol	Splitless
<i>Octanoato de etilo</i>	37,6	88,0+101,0+187,0	Heptanoato de etilo	Splitless
<i>Ácido acético</i>	38,1	43,0+60,0	2-Octanol	Splitless
<i>Benzaldehído</i>	42,1	105,0	3,4-dimetilfenol	Splitless
<i>Linalool</i>	44,6	93,0+121,0+136,0	2-Octanol	Splitless
<i>Acetato de linalool</i>	45,5	93,0+121,0+136,0	2-Octanol	Splitless
<i>Ácido butírico</i>	48,9	41,0+63,0+70,0	2-Octanol	Splitless
<i>Decanoato de etilo</i>	49,9	88,0+101,0+155,0	Heptanoato de etilo	Splitless
<i>Ácido isovaleriánico</i>	51,3	42,0+60,0	2-Octanol	Splitless
<i>Succinato de dietilo</i>	51,8	101,0+129,0	2-Octanol	Splitless
<i>Acetato de feniletilo</i>	59,1	103,9	2-Octanol	Splitless
<i>β-damascenona</i>	59,5	121,0	3,4-dimetilfenol	Splitless
<i>Ácido hexanoico</i>	60,9	60,0+73,0+87,0	2-Octanol	Splitless
<i>Geraniol</i>	61,4	69,0+123,0	3,4-dimetilfenol	Splitless
<i>Alcohol bencílico</i>	62,3	79,0+108,0	2-Octanol	Splitless

<b><i>E-whiskylactona</i></b>	63,2	99,0	2-Octanol	Splitless
<b><i>β-feniletanol</i></b>	64,2	91,0+92,0+122,0	2-Octanol	Splitless
<b><i>Ácido octanoico</i></b>	71,8	60,0+73,0+101,0	2-Octanol	Splitless
<b><i>Ácido decanoico</i></b>	81,6	60,0+73,0+129,0	2-Octanol	Splitless

Tabla 3. Compuestos identificados tras el análisis HSD-SPE.

Tras disponer de la lista de compuestos, se integran los cromatogramas con el programa MS DATA Review para obtener áreas tanto de los compuestos aromáticos como de los estándares internos.

Para la cuantificación, se emplean áreas relativas de los volátiles al estándar correspondiente según aparece en las Tablas 1-10 del anexo.

Finalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de 1 factor para determinar diferencias significativas entre las áreas relativas encontradas para cada compuesto en los 9 cartuchos “hijos” (datos por triplicado). El programa utilizado fue XLSTAT Software Estadístico para Excel. También se realizó el mismo ANOVA considerando los 10 extractos (9 “hijos”+ “madre”) obtenidos por triplicado.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización aromática inicial del vino

Del análisis de 38 compuestos aromáticos trazas y 29 mayoritarios, se obtienen las concentraciones de las que partimos en la muestra de vino tinto. Los análisis se realizaron por duplicado obteniendo los siguientes compuestos identificados y sus respectivas concentraciones.

Compuestos	Concentración	Análisis
<b>Compuestos Carbonílicos</b>		
Acetoina	58,81±10,58	Mayoritarios
Siringaldehído*	0,28±0,01	Trazas
β-damascenona	3,36±0,06	Trazas
α-ionona	0,62±0,03	Trazas
β-ionona	1,13±0,16	Trazas
Acetaldehído	1,33±0,87	Mayoritarios
Benzaldehído	7,97±0,22	Trazas
Diacetilo	2,39±0,04	Mayoritarios



<b>Ésteres</b>		
Acetato de etilo	51,05±0,10	Mayoritarios
Propanoato de etilo	0,15±0,03	Mayoritarios
Butirato de etilo	0,15±0,05	Mayoritarios
Acetato de isoamilo	1,20±0,43	Mayoritarios
Hexanoato de etilo	0,42±0,09	Mayoritarios
Acetato de hexilo	<LD	Mayoritarios
Lactato de etilo	79,95±5,01	Mayoritarios
Octanoato de etilo	0,28±0,03	Mayoritarios
Decanoato de etilo	0,50±0,12	Mayoritarios
Succinato de dietilo	13,48±3,37	Mayoritarios
Isobutirato de etilo	141,69±6,18	Trazas
Acetato de isobutilo	55,13±4,26	Trazas
2-Metilbutirato de etilo	8,08±0,14	Trazas
Isovalerato de etilo	19,25±2,53	Trazas
Acetato de butilo	7,13±1,28	Trazas
Acetato de feniletilo	89,46±1,31	Trazas
Dihidrocinamato de etilo	<LD	Trazas
Cinamato de etilo	5,98±0,22	Trazas
Vanillato de metilo	31,87±2,50	Trazas
Vanillato de etilo	130,05±19,50	Trazas
<b>Alcoholes</b>		
Metionol	2,11±0,33	Mayoritarios
1-Butanol	1,50±0,18	Mayoritarios
Isobutanol	40,48±4,83	Mayoritarios
Alcohol isoamílico	232,44±14,15	Mayoritarios
1-Hexanol	1,95±0,04	Mayoritarios
Z-3-hexenol	0,04±0,00	Mayoritarios
Alcohol bencílico	0,60±0,01	Mayoritarios
β-feniletanol	37,22±0,03	Mayoritarios
<b>Fenoles volátiles</b>		

Guaiacol	16,41±1,47	Trazas
o-Cresol	2,04±0,08	Trazas
4-Etilguaiacol	0,63±0,23	Trazas
<i>m</i> -Cresol	0,43±0,06	Trazas
4-Propilguaiacol	0,12±0,11	Trazas
Eugenol	2,63±0,04	Trazas
4-Etilfenol	1,15±0,01	Trazas
4-Vinilguaiacol	20,81±2,09	Trazas
Isoeugenol	2,25±0,05	Trazas
2,6-Dimetoxifenol	34,10±4,76	Trazas
4-Vinilfenol	25,32±1,46	Trazas
4-alil-2,6-dimetoxifenol	4,82±0,45	Trazas
Vanillina	19,04±1,64	Trazas
Acetovanillona	89,10±7,8	Trazas
<b>Terpenoles</b>		
Linalool	13,56±0,03	Trazas
α-Terpineol	7,07±0,24	Trazas
β-citronelol	8,28±0,59	Trazas
Geraniol	11,15±0,14	Trazas
Acetato de linalool	1,35±0,10	Trazas
<b>Lactonas</b>		
γ-butirolactona	12,98±2,00	Mayoritarios
E-whiskylactona	4,93±2,80	Trazas
Z-whiskylactona	5,99±0,19	Trazas
γ-nonolactona	22,71±0,71	Trazas
γ-decalactona	1,97±0,7	Trazas
<b>Ácidos</b>		

Ácido acético	333,81±31,12	Mayoritarios
Ácido isobutírico	1,35±0,11	Mayoritarios
Ácido butírico	0,49±0,12	Mayoritarios
Ácido isovaleriánico	1,09±0,36	Mayoritarios
Ácido hexanoico	1,74±0,06	Mayoritarios
Ácido octanoico	2,21±0,34	Mayoritarios
Ácido decanoico	0,49±0,06	Mayoritarios

Tabla 4. Compuestos identificados mediante el análisis de mayoritarios y de trazas clasificados por grupos funcionales. Las concentraciones de mayoritarios se expresan en  $\text{mg l}^{-1}$  y las de trazas en  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Las desviaciones estándar se calculan con  $n=2$ . <LD por debajo del límite de detección. \*Resultado expresado como área relativa a la vainilla.

Hay que tener en cuenta que son análisis directos del vino y no del espacio de cabeza por lo que este es el número máximo de compuestos que nos podemos encontrar en nuestro experimento. El análisis del espacio de cabeza será menos sensible, determinando solo lo que se desprenda del vino, acercándose más a la interpretación sensorial del vino. Mediante HSD-SPE se han determinado 32 compuestos.

#### 4.2 Cromatogramas obtenidos de los análisis HSD-SPE

La imagen 3 muestra uno de los 30 cromatogramas obtenidos de las inyecciones en splitless y la imagen 4 muestra uno de los 30 cromatogramas obtenidos de las inyecciones en split.

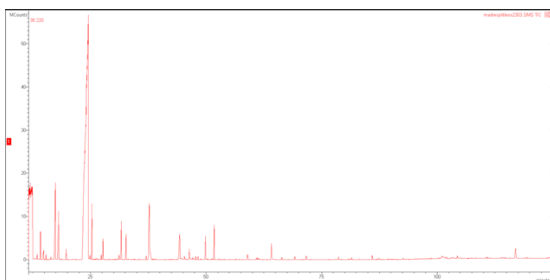


Imagen 3. Cromatograma del cartucho madre inyectado en Splitless

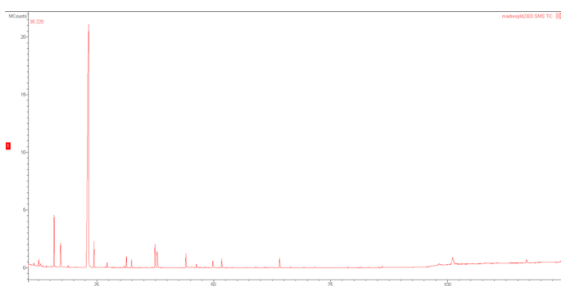


Imagen 4. Cromatograma del cartucho madre inyectado en Split

Los compuestos que se encuentran en concentraciones elevadas como el isobutanol y el acetato de isoamilo tienen el pico saturado si se inyecta el extracto en splitless, por eso esos datos los obtenemos del análisis en split. Además, los compuestos que salen al principio del cromatograma como el acetato de isobutilo, pueden perderse con el disolvente si se inyecta en splitless y por ello hemos inyectado también en modo split. Solo estos 3 compuestos se han determinado en modo Split.

#### 4.3 Perfil de volatilización del vino y curvas de ruptura de compuestos volátiles

Cómo ya se ha mencionado antes, para la cuantificación se utilizan áreas relativas a los correspondientes estándares, según aparece en la tabla 4. Los resultados obtenidos de las tres réplicas se pueden agrupar en 10 tablas (una para cada cartucho). Estas tablas se pueden observar en los Anexos.

Las medias para cada cartucho y su desviación estándar ( $s$ ,  $n=3$ ) aparecen en la siguiente tabla resumen (tabla 5) para los 32 compuestos cuantificados. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas de lo purgado y recogido cada hora entre los 10 cartuchos según el test Fisher con  $p < 0,05$ .

Según se observa en la tabla 5 y en los anexos la irreproducibilidad de los 3 ensayos supera para muchos compuestos el 20%. Hay que tener en cuenta que se trata de experiencias complejas que incluyen desviaciones de muchas acciones: pipeteos, enrasas, tiempos de borboteo, retención, elución, concentración, inyección, cromatografía e integración.

Compuestos	Acetato de isobutilo	2-Metilbutirato de etilo	Butirato de etilo	Isovalerato de etilo	Acetato de butilo	1-Butanol
Cartucho 1	-	-	-	3,41E-03±1,38E-03 <sup>d</sup>	2,72E-03±1,02E-03 <sup>c</sup>	2,16E-02±7,68E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 2	-	-	1,77E-03±1,04E-03 <sup>b</sup>	3,69E-03±1,70E-03 <sup>d</sup>	5,98E-04±1,58E-05 <sup>c</sup>	1,73E-02±1,06E-02 <sup>b</sup>
Cartucho 3	-	-	1,71E-02±1,36E-03 <sup>b</sup>	7,22E-03±7,30E-03 <sup>d</sup>	2,94E-03±1,59E-03 <sup>c</sup>	1,51E-02±1,35E-02 <sup>b</sup>
Cartucho 4	-	-	2,88E-02±1,25E-02 <sup>b</sup>	1,36E-01±2,75E-02 <sup>c</sup>	3,41E-03±1,03E-03 <sup>c</sup>	1,15E-02±6,54E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 5	-	-	3,75E-02±5,36E-03 <sup>b</sup>	1,57E-01±2,48E-02 <sup>c</sup>	1,33E-02±1,92E-04 <sup>bc</sup>	6,62E-03±4,27E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 6	-	-	4,49E-02±6,73E-03 <sup>b</sup>	1,74E-01±3,70E-02 <sup>bc</sup>	4,36E-02±1,56E-02 <sup>b</sup>	2,52E-02±8,61E-04 <sup>b</sup>
Cartucho 7	-	-	4,46E-02±1,28E-04 <sup>b</sup>	2,26E-01±2,49E-03 <sup>a</sup>	1,51E-01±9,62E-03 <sup>a</sup>	3,55E-02±3,62E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 8	-	-	3,64E-02±8,15E-03 <sup>b</sup>	2,16E-01±3,95E-02 <sup>ab</sup>	1,55E-01±2,61E-02 <sup>a</sup>	2,03E-02±2,00E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 9	-	-	3,93E-02±1,47E-02 <sup>b</sup>	2,25E-01±2,13E-03 <sup>a</sup>	1,54E-01±3,49E-02 <sup>a</sup>	2,49E-02±6,45E-03 <sup>b</sup>
Cartucho Madre	0,83±0,08	0,16±0,03	2,50±0,57 <sup>a</sup>	0,14±2,22E-03 <sup>c</sup>	0,02±2,26E-02 <sup>bc</sup>	1,63±0,15 <sup>a</sup>
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Compuestos	Isobutanol	Hexanoato de etilo	Acetato de hexilo	Acetoina	Lactato de etilo	1-hexanol
Cartucho 1	2,04E-02±6,31E-03 <sup>c</sup>	2,78E-03±6,00E-04 <sup>b</sup>	8,21E-03±2,78E-03 <sup>b</sup>	-	-	5,09E-03±2,83E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 2	2,10E-02±2,28E-03 <sup>c</sup>	2,41E-03±4,19E-04 <sup>b</sup>	5,36E-03±7,41E-04 <sup>b</sup>	-	-	7,51E-03±3,16E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 3	8,48E-02±3,99E-02 <sup>c</sup>	3,77E-03±2,26E-03 <sup>b</sup>	5,24E-03±6,89E-04 <sup>b</sup>	-	-	5,37E-03±1,38E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 4	3,76E-02±4,22E-02 <sup>c</sup>	2,28E-03±4,08E-04 <sup>b</sup>	4,27E-03±9,92E-05 <sup>b</sup>	-	-	5,56E-03±2,03E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 5	4,53E-01±5,60E-02 <sup>c</sup>	7,50E-04±7,07E-04 <sup>b</sup>	1,34E-02±1,41E-03 <sup>b</sup>	-	-	5,42E-03±9,10E-05 <sup>b</sup>
Cartucho 6	1,17±0,12 <sup>c</sup>	3,65E-03±2,12E-04 <sup>b</sup>	9,39E-03±6,34E-04 <sup>b</sup>	-	-	5,17E-03±5,94E-04 <sup>b</sup>
Cartucho 7	3,46±0,55 <sup>b</sup>	2,00E-03±6,86E-04 <sup>b</sup>	2,03E-02±2,95E-04 <sup>b</sup>	-	-	5,72E-03±1,86E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 8	3,86±1,20 <sup>b</sup>	2,80E-03±8,68E-05 <sup>b</sup>	1,76E-02±3,97E-03 <sup>b</sup>	-	-	6,74E-03±3,31E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 9	3,81±1,47 <sup>b</sup>	1,71E-03±1,93E-04 <sup>b</sup>	1,70E-02±3,91E-03 <sup>b</sup>	-	-	6,51E-03±1,95E-03 <sup>b</sup>
Cartucho Madre	9,53±0,93 <sup>a</sup>	3,78±1,17 <sup>a</sup>	0,76±0,09 <sup>a</sup>	3,82±0,09	1,44±0,45	6,44±0,04 <sup>a</sup>
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Compuestos	Z-3-hexenol	Octanoato de etilo	Ácido acético	Ácido butírico	Decanoato de etilo	Ácido isovaleriánico
Cartucho 1	-	0,35±0,04 <sup>b</sup>	0,15±0,03 <sup>b</sup>	8,73E-03±2,76E-03 <sup>b</sup>	3,11E-02±5,99E-03 <sup>b</sup>	9,03E-03±1,42E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 2	-	0,44±0,02 <sup>b</sup>	0,13±0,04 <sup>b</sup>	7,25E-03±4,04E-03 <sup>b</sup>	2,55E-02±6,06E-03 <sup>b</sup>	6,57E-03±4,52E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 3	-	0,46±0,05 <sup>b</sup>	1,72E-01±3,50E-03 <sup>b</sup>	8,29E-03±3,06E-04 <sup>b</sup>	2,72E-02±2,04E-03 <sup>b</sup>	5,11E-03±7,83E-04 <sup>b</sup>
Cartucho 4	-	0,47±0,01 <sup>b</sup>	0,18±0,05 <sup>b</sup>	1,17E-02±4,20E-03 <sup>b</sup>	2,50E-02±1,65E-02 <sup>b</sup>	4,11E-03±1,57E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 5	-	4,65E-01±3,48E-03 <sup>b</sup>	0,18±0,02 <sup>b</sup>	5,12E-03±1,44E-03 <sup>b</sup>	3,00E-02±3,28E-03 <sup>b</sup>	5,47E-03±2,16E-04 <sup>b</sup>
Cartucho 6	-	0,47±0,02 <sup>b</sup>	0,24±0,02 <sup>b</sup>	1,36E-02±9,51E-04 <sup>b</sup>	2,61E-02±1,34E-03 <sup>b</sup>	1,02E-02±1,65E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 7	-	4,70E-01±4,14E-03 <sup>b</sup>	0,27±0,01 <sup>b</sup>	1,29E-02±1,08E-04 <sup>b</sup>	2,66E-02±9,76E-04 <sup>b</sup>	1,04E-02±7,32E-04 <sup>b</sup>
Cartucho 8	-	0,47±0,03 <sup>b</sup>	0,30±0,05 <sup>b</sup>	1,88E-02±4,98E-04 <sup>b</sup>	2,60E-02±1,20E-02 <sup>b</sup>	1,60E-02±7,00E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 9	-	0,47±0,04 <sup>b</sup>	0,29±0,03 <sup>b</sup>	2,78E-02±7,00E-03 <sup>b</sup>	4,27E-02±1,84E-02 <sup>b</sup>	1,65E-02±6,74E-03 <sup>b</sup>
Cartucho Madre	0,09±0,03	8,72±0,88 <sup>a</sup>	21,99±3,92 <sup>a</sup>	0,24±0,05 <sup>a</sup>	5,45±1,00 <sup>a</sup>	0,20±0,06 <sup>a</sup>

Compuestos	Succinato de dietilo	Ácido hexanoico	Alcohol bencílico	$\beta$ -feniletanol	Ácido octanoico	Ácido decanoico
Cartucho 1	-	2,75E-03±1,27E-03 <sup>b</sup>	7,98E-03±1,70E-03 <sup>b</sup>	4,90E-03±1,03E-03 <sup>b</sup>	1,21E-01±4,89E-02 <sup>b</sup>	3,28E-02±8,53E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 2	-	1,76E-02±1,00E-02 <sup>b</sup>	4,72E-03±1,58E-03 <sup>b</sup>	1,10E-02±1,00E-02 <sup>b</sup>	1,60E-01±6,92E-04 <sup>b</sup>	4,32E-02±4,92E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 3	-	3,21E-02±3,47E-05 <sup>b</sup>	3,54E-03±3,47E-04 <sup>b</sup>	2,36E-02±1,59E-02 <sup>b</sup>	1,27E-01±1,23E-02 <sup>ab</sup>	4,75E-02±2,28E-02 <sup>b</sup>
Cartucho 4	-	2,85E-02±1,04E-02 <sup>b</sup>	2,57E-03±9,22E-05 <sup>b</sup>	2,03E-02±6,42E-03 <sup>b</sup>	1,86E-01±7,90E-03 <sup>a</sup>	4,80E-02±5,72E-04 <sup>b</sup>
Cartucho 5	-	4,00E-02±3,66E-04 <sup>b</sup>	1,48E-02±1,37E-02 <sup>b</sup>	7,92E-03±2,39E-03 <sup>b</sup>	1,94E-01±4,97E-03 <sup>a</sup>	5,47E-02±6,34E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 6	-	3,64E-02±7,85E-04 <sup>b</sup>	1,25E-02±3,30E-03 <sup>b</sup>	1,39E-02±3,83E-03 <sup>b</sup>	1,98E-01±1,52E-02 <sup>a</sup>	4,83E-02±1,82E-02 <sup>b</sup>
Cartucho 7	-	3,52E-02±2,61E-03 <sup>b</sup>	5,85E-03±1,50E-05 <sup>b</sup>	1,53E-02±3,57E-03 <sup>b</sup>	1,99E-01±2,34E-02 <sup>a</sup>	4,89E-02±1,02E-02 <sup>b</sup>
Cartucho 8	-	4,20E-02±1,31E-02 <sup>b</sup>	1,15E-02±2,02E-03 <sup>b</sup>	1,27E-02±3,31E-03 <sup>b</sup>	2,02E-01±7,10E-03 <sup>a</sup>	4,93E-02±6,98E-03 <sup>b</sup>
Cartucho 9	-	3,83E-02±3,80E-03 <sup>b</sup>	1,14E-02±5,81E-04 <sup>b</sup>	1,01E-02±3,35E-03 <sup>b</sup>	2,00E-01±2,01E-02 <sup>a</sup>	4,85E-02±3,76E-04 <sup>b</sup>
Cartucho Madre	12,39±1,35	0,54±0,11 <sup>a</sup>	0,14±0,05 <sup>a</sup>	8,75±0,46 <sup>a</sup>	1,06±0,06	0,62±0,18 <sup>a</sup>
p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Compuestos	<i>Benzaldehído</i>	<i>Linalool</i>	<i>Acetato de linalool</i>	<i>Acetato de feniletilo</i>	$\beta$ - <i>damascenona</i>	<i>Geraniol</i>	<i>E-whiskylactona</i>	<i>Acetato de isoamilo</i>
<b>Cartucho 1</b>	3,75E-02±1,51E-02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	0,30±0,09 <sup>a</sup>	5,47E-03±2,61E-03 <sup>b</sup>	-
<b>Cartucho 2</b>	3,12E-02±6,36E-03 <sup>b</sup>	-	-	-	-	2,97E-01±3,23E-02 <sup>a</sup>	5,67E-03±2,07E-03 <sup>b</sup>	-
<b>Cartucho 3</b>	2,74E-02±1,34E-02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	0,28±0,08 <sup>a</sup>	6,36E-03±4,48E-04 <sup>ab</sup>	-
<b>Cartucho 4</b>	2,02E-02±1,50E-03 <sup>b</sup>	-	-	-	-	2,96E-01±3,96E-02 <sup>a</sup>	7,27E-03±5,48E-03 <sup>ab</sup>	-
<b>Cartucho 5</b>	4,00E-02±1,36E-02 <sup>b</sup>	-	-	-	-	2,95E-01±2,33E-02 <sup>a</sup>	1,35E-02±7,18E-04 <sup>a</sup>	-
<b>Cartucho 6</b>	3,96E-02±2,79E-03 <sup>b</sup>	-	-	-	-	0,30±0,02 <sup>a</sup>	8,18E-03±4,41E-04 <sup>ab</sup>	-
<b>Cartucho 7</b>	4,49E-02±3,15E-03 <sup>b</sup>	-	-	-	-	0,30±0,04 <sup>a</sup>	7,51E-03±4,34E-03 <sup>ab</sup>	-
<b>Cartucho 8</b>	2,96E-02±2,05E-03 <sup>b</sup>	-	-	-	-	3,00E-01±1,77E-02 <sup>a</sup>	7,46E-03±2,12E-03 <sup>ab</sup>	-
<b>Cartucho 9</b>	3,66E-02±4,35E-03 <sup>b</sup>	-	-	-	-	3,04E-01±1,38E-02 <sup>a</sup>	1,22E-02±3,93E-04 <sup>ab</sup>	-
<b>Cartucho Madre</b>	0,43±0,11 <sup>a</sup>	0,03±0,02	0,02±0,01	0,45±0,07	0,05±0,02	0,28±0,02 <sup>a</sup>	8,75E-03±7,20E-03 <sup>ab</sup>	0,68±0,22
<b>p</b>	<0,0001	0,003	0,001	<0,0001	<0,0001	1,000	0,330	<0,0001

Tabla 5. Medias y desviaciones estándares (*s*, n=2 ó 3, dependiendo del cartucho) de las áreas relativas obtenidas para los 32 compuestos detectados en los 10 cartuchos acoplados al sistema HSD-SPE. Diferentes superíndices indica diferencias significativas entre los 10 cartuchos según Fisher ( $p=0,05$ ).

#### 4.4 Discusión

En primer lugar, hay que hacer notar que la cantidad de compuestos identificados varía entre métodos de extracción. Durante la caracterización inicial se identifican y cuantifican 67 compuestos mientras que con el método de espacio de cabeza dinámico se identificaron 32 compuestos.

La principal diferencia radica en que, en el primer caso, se trata de una extracción líquido-líquido y una extracción en fase sólida (SPE) directa sobre la totalidad de la muestra, mientras que, en el segundo, se trata de una extracción en fase sólida de los compuestos existentes en el espacio de cabeza del vino. Los analitos que son más polares y pequeños se encuentran más retenidos en la fase acuosa del vino y por tanto pasan en una proporción muy pequeña al espacio de cabeza. Puede llegar a haber 4 órdenes de magnitud de diferencia entre la recuperación en un sistema HS-SPE aplicado a vino para un compuesto apolar como el decanal o un compuesto polar como el vanillato de metilo<sup>11</sup>. Desde el punto de vista del análisis del aroma es importante que el extracto se parezca lo más posible a lo que llega a la pituitaria ya que es lo que percibimos.

Las recuperaciones en el mejor de los casos pueden rondar 1-10% por lo que los compuestos presentes en concentraciones muy pequeñas en el vino suelen ser imposibles de determinar mediante sistemas de espacio de cabeza, sobre todo si están unidos a GC-MS. Mediante GC-O en algunos casos no hay pico, pero se pueden determinar mediante señal olfatométrica. Por facilidad para el trabajo y medidas anti COVID se ha preferido usar GC-MS en lugar de GC-O.

Analizando los resultados obtenidos de los analitos que sí se pueden identificar mediante HSD-SPE-GC-MS podemos observar que existen tres grupos de compuestos.

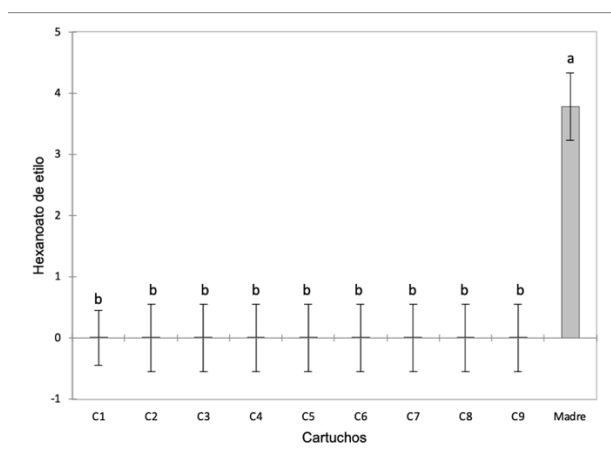
1.- Por un lado, hay compuestos que únicamente se encuentran en el extracto obtenido a partir del cartucho madre y no en ninguno de los hijos. Estos volátiles son acetato de isobutilo, acetato de isoamilo, 2-metilbutirato de etilo, acetoína, lactato de etilo, Z-3-hexenol, succinato de dietilo, linalool, acetato de linalool, acetato de feniletilo y  $\beta$ -damascenona. Son compuestos que no han alcanzado el volumen de ruptura en el cartucho SPE utilizado a lo largo de las 9 horas. El cartucho madre no se ha saturado de estos compuestos, por lo que con la metodología usada se podría muestrear 80x9=720mL de vino con el fin de tener un sistema HS-SPE más sensible del usado



actualmente. Hoy por hoy para la obtención de extractos de olfatometría se purga 100 minutos, 80 mL de vino.

Otros, que sí que aparecen en los cartuchos hijos, pero en una proporción muy pequeña (<5%) comparados con el cartucho madre son el butirato de etilo, 1-butanol, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, 1-hexanol, ácido acético, decanoato de etilo y  $\beta$ -feniletanol. Como en el caso anterior, esto se debe a que el cartucho madre no llega a saturarse, es decir, no alcanza el volumen de ruptura y por tanto los compuestos no pasan de forma significativa al segundo cartucho tras  $60 \times 9 = 540$  minutos de purga. Este tiempo de purgado frente a los 100 minutos empleados en el protocolo estándar es una forma de aumentar la sensibilidad pudiendo asegurar que no habrá pérdidas tanto de los compuestos anteriores como de estos.

La gráfica 1 muestra las áreas relativas del hexanoato de etilo en cada uno de los cartuchos de SPE acoplados al sistema de espacio de cabeza dinámico. Se observa que la cantidad de analito retenido en los cartuchos situados después del cartucho madre es insignificante respecto al mismo.



Gráfica 1..Área relativa del hexanoato de etilo obtenida en cada uno de los “cartuchos hijos” y en el “cartucho madre”. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p=0,05$ ) ANOVA aplicado a los 10 cartuchos.

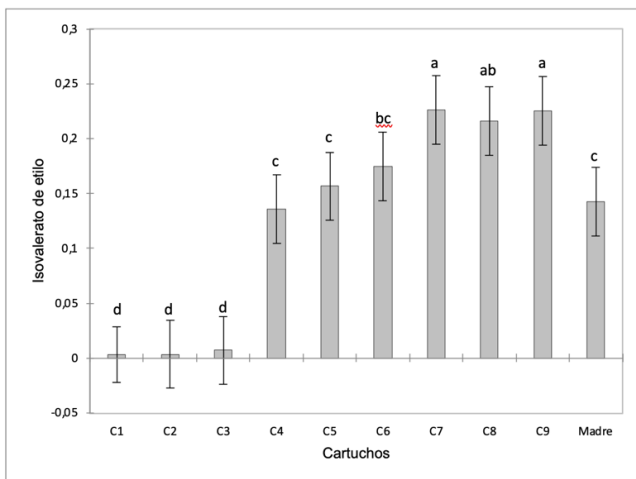
Un comportamiento similar al que aparece en la gráfica 1 lo tienen en su mayoría compuestos poco polares pertenecientes a diferentes familias:

- Alcoholes: linalool, Z-3-hexenol, 1-hexanol y  $\beta$ -feniletanol.
- Ésteres de etilo: 2-metilbutirato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo, decanoato de etilo, lactato de etilo y succinato de dietilo.
- Acetatos: acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de linalool, acetato de feniletilo, acetato de hexilo

- Compuestos carbonílicos: acetoína, ácido acético y  $\beta$ -damascenona.

2.- Sin embargo, se observan compuestos que muestran un comportamiento diferente al anterior. En este caso, después de un tiempo de purga en el que los volátiles solo se retienen en el primer cartucho, los analitos son encontrados en los cartuchos hijos lo que significa que el cartucho madre se satura tras haber purgado una cantidad de vino. Es decir, el cartucho de 400mg de resinas Isolute ENV+ conectado directamente al sistema HSD alcanza su volumen de ruptura y por tanto si la purga continuara con este mismo cartucho, perderíamos compuesto y por tanto no estaríamos mejorando la sensibilidad en el análisis.

A continuación, se muestran algunos ejemplos.

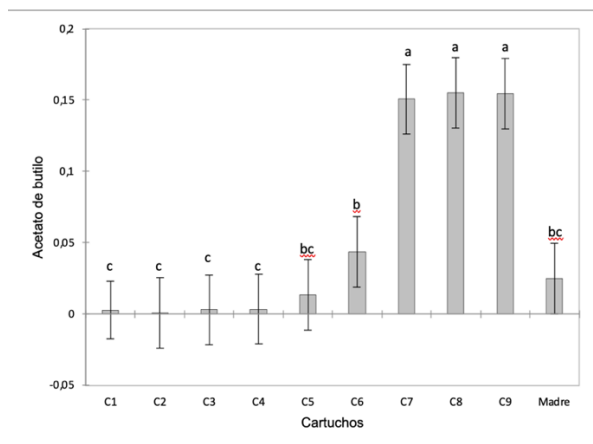


Gráfica 2. Área relativa del isovalerato de etilo obtenida en cada uno de los “cartuchos hijos” y en el “cartucho madre”. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p=0,05$ ) ANOVA aplicado a los 10 cartuchos.

El isovalerato de etilo es un compuesto muy pequeño y, por tanto, muy volátil. Esto hace que se alcance rápido el volumen de ruptura. En la gráfica 2, se observa que hay pérdidas significativas a partir del cartucho 4. Si se quiere aumentar la sensibilidad en la determinación de isovalerato de etilo el volumen mayor de vino a purgar es de 240 ml con el sistema SPE usado.

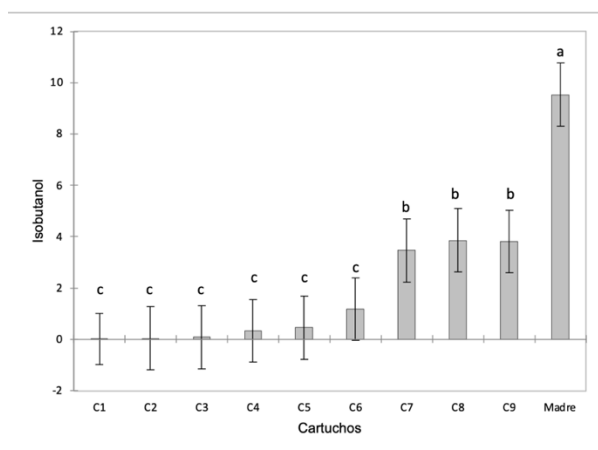
Puede observarse que el “cartucho madre” tiene menor cantidad de isovalerato de etilo que los hijos C7, C8 y C9, donde se había alcanzado el máximo. Hay que tener en cuenta que tanto en el cartucho “madre” como en la columna cromatográfica son muchos los compuestos que han interactuado con las respectivas fases estacionarias y por tanto puede haber habido alguna interferencia o discriminación entre los analitos. Esto mismo se ve más acusado en la gráfica 3 del acetato de butilo. El cartucho “madre” parece

haber perdido capacidad de retención frente a C7, C8 y C9 o se ha perdido el analito tan pequeño y volátil después de haberse retenido, debido a los 60x9=540 minutos en los que ha estado pasando nitrógeno con etanol desprendido del vino, frente a los 60 minutos que lo ha hecho en cualquiera de los hijos.



Gráfica 3. Área relativa del acetato de butilo obtenida en cada uno de los “cartuchos hijos” y en el “cartucho madre”. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p=0,05$ ) ANOVA aplicado a los 10 cartuchos.

Con respecto al volumen de ruptura y la posibilidad de aumentar la sensibilidad en el sistema HS-SPE, puede observarse en la gráfica 3 que para el acetato de butilo la sensibilidad máxima se alcanzaría con 320 ml de vino.

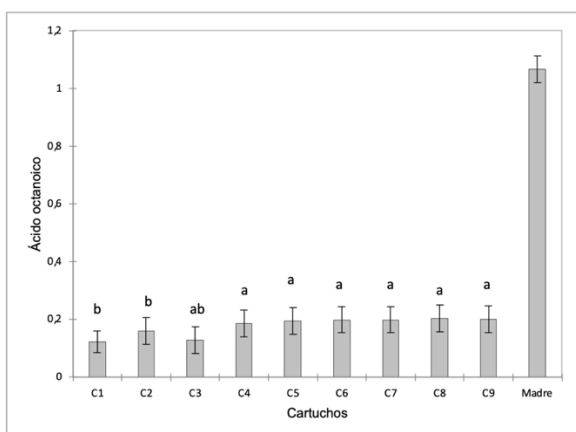


Gráfica 4. Área relativa del isobutanol obtenida en cada uno de los “cartuchos hijos” y en el “cartucho madre”. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p=0,05$ ) ANOVA aplicado a los 10 cartuchos.

En el caso del isobutanol, en la gráfica 4 se observa que el aumento del área relativa en los cartuchos hijos es muy lenta, no alcanzándose en ningún momento la señal obtenida en el cartucho “madre”. El volumen de ruptura no se alcanza hasta el cartucho 5 que retiene una cantidad próxima al 5% de la cantidad del “cartucho madre”. Esto indica que

se puede aumentar la sensibilidad en la determinación de isobutanol permitiendo la purga de 400 ml de vino, a partir de este volumen de muestra, comenzará a haber pérdidas significativas si se usan 400mg de resinas Isolute ENV+.

3.- Por último, hay un tipo de compuestos en los que desde el primer momento se está perdiendo analito de forma significativa con la cantidad de resina probada durante 60 minutos. Este grupo está formado por compuestos como ácido butírico, ácido isovaleriánico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico y alcohol bencílico. Se debería probar con más cantidad de resina para mejorar la sensibilidad.



Gráfica 5. Área relativa del ácido octanoico obtenida en cada uno de los “cartuchos hijos” y en el “cartucho madre”. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Fisher ( $p=0,05$ ) ANOVA aplicado a los 9 cartuchos.

En el caso del ácido octanoico, como se ve en la gráfica 5, se observa desde el inicio una pérdida constante de aproximadamente un 10-20% por cada hora de purga.

Se realiza un ANOVA de 1 factor solamente a los cartuchos “hijos”, excluyendo al cartucho “madre”, para ver si hay diferencias significativas entre ellos y ver si la pérdida aumenta con el tiempo de purga. Los resultados obtenidos muestran que los dos primeros cartuchos difieren significativamente de los otros siete. Es decir, con este método y este analito, siempre va a haber pérdidas superiores al 5% y además aumenta significativamente a partir de los 160 ml de vino purgados.

## 5. CONCLUSIONES

Utilizando cartuchos en tándem se ha estudiado la posibilidad de aumentar la sensibilidad del sistema HSD-SPE pasando volúmenes crecientes de espacio de cabeza, aumentando el tiempo de purga del protocolo estándar (80mL de vino, 100min de purga) y asegurando que no se llega a perder compuesto de forma significativa. Se

observa que con algunos compuestos más apolares (ésteres, alcoholes, acetatos y algún compuesto carbonílico) se puede multiplicar por 5 la sensibilidad del método. En compuestos como el isovalerato de etilo, acetato de butilo o isobutanol, más polares, solo puede duplicarse o triplicarse la sensibilidad purgando un volumen de vino mayor o pasando más espacio de cabeza. Sin embargo, el alcohol bencílico y los ácidos más apolares que el ácido acético sufren pérdidas ya con el protocolo estándar por lo que no es posible obtener un extracto más concentrado con las resinas Isolute ENV+ sin perder compuesto de forma significativa ya en la primera hora de purga.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Maarse, H., Volatile compounds in food and beverages. In *Volatile compounds in food and beverages*, Dekker, M., Ed. New York, **1991**.
2. Ferreira, V.; Cacho, J. Identification of Impact Odorants of Wines. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Editor, Ed.; **2009**; pp 393–415.
3. Callement, G., Bouchet, M., Langlois, D., Etievant, P., Salles, C., Odor intensity measurements in gas chromatography - olfactometry using cross modality matching: evaluation of training effects. In *Gas chromatography - olfactometry. The state of the art.*, Leland, J. V., Schieberle, P., Buettner, A., Acree, T. A., Ed. ACS: **2001**; pp 172 - 186.
4. Deibler, K. D.; Lavin, E. H.; Linforth, R. S. T.; Taylor, A. J.; Acree, T. E. Verification of a Mouth Simulator by in Vivo Measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, pp 1388–1393.
5. Roberts, D. D.; Acree, T. E. Simulation of Retronasal Aroma Using a Modified Headspace Technique: Investigating the Effects of Saliva, Temperature, Shearing, and Oil on Flavor Release. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43* (8), 2179–2186.
6. Ferreira, V. L., R.; Aznar, M., *Olfactometry and Aroma Extract Dilution Analysis of Wines*. **2001**; Vol. 21, p 89-122.
7. Campo, E. M. La Base Química Del Aroma de Vinos Blancos de Variedades Españolas y de Diversos Vinos Especiales, Universidad de Zaragoza, **2006**.
8. Escudero, A.; San-Juan, F.; Franco-Luesma, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Is Orthonasal Olfaction an Equilibrium Driven Process? Design and Validation of a

- Dynamic Purge and Trap System for the Study of Orthonasal Wine Aroma.  
*Flavour Fragr. J.* **2014**, 29 (5), 296–304.
9. Ferreira, V. *Cromatorafía: Fundamentos y Práctica*; **1997**.
  10. De la Fuente Blanco, A; Ferreira, V. Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) for the (Semi)Quantitative Screening of Wine Aroma. V. *Foods* **2020**, 9, 1892.
  11. San-Juan, F.; Pet'ka, J.; Cacho, J.; Escudero, A. Producing Headspace Extracts for the Gas Chromatography-Olfactometric Evaluation of Wine Aroma. *Food Chem.* **2010**, 838.
  12. Ortega, C.; Lopez, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of a new method based on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromatogr., A.* **2001**, 923 (1-2), 205–214.
  13. Lopez, R.; Aznar, M.; Cacho, J.; Ferreira, V. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr., A* **2002**, 966 (1–2), 167–177.