



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Nutrició i Bromatologia**

Facultat de Farmàcia  
Av. Joan XXIII, s/n  
08028 Barcelona  
Tel. 34-93 402 45 08  
Fax 34-93 403 59 31

# CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN BEBIDAS DERIVADAS DE FRUTA

Memoria presentada por:

**MONTSERRAT RIU AUMATELL**

para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat: Medicaments, Alimentació i Salut (bienni: 2000-02)

Directoras:

Dra. SUSANA BUXADERAS SÁNCHEZ

Dra. ELVIRA LÓPEZ TAMAMES

Barcelona, diciembre 2005



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Nutrició i Bromatologia**

Facultat de Farmàcia

Av. Joan XXIII, s/n

08028 Barcelona

Tel. 34-93 402 45 08

Fax 34-93 403 59 31

La Dra Susana Buxaderas Sánchez y la Dra Elvira López Tamames, profesoras Titulares del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona

**EXPONEN** que el presente trabajo titulado: " Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta" y que constituye la Memoria presentada por Montserrat Riu Aumatell para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizado en el Departament de Nutrició i Bromatologia bajo su dirección. Asimismo, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firman la presente, en Barcelona, a 25 de noviembre de 2005.

Dra. Susana Buxaderas Sánchez

Dra. Elvira López Tamames

Este trabajo ha sido financiado por:

- La Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) del Ministerio de Ciencia y Tecnología, Subdirección general de prospectiva y coordinación de programas a través de los proyectos del INIA Acción especial para el vino VIN01-051 y de la Acción Integrada España-Italia HI1999-0121.

- La Generalitat de Catalunya mediante la Ayuda para *Grups de recerca consolidats* 2001SGR-00131.

- La Universitat de Barcelona por la *Beca Pre-doctoral de Formació en la Recerca i la Docència* concedida en mayo de 2000, renovada 2001, 2002, 2003.

Para la realización de este trabajo se ha contado con la colaboración de las bodegas del grupo Freixenet S.A.

## AGRAÏMENTS

Finalment després de tan de temps ha arribat el moment d'acabar una etapa. Durant aquests anys nombroses persones han estat al meu costat i de manera directa o indirecta m'han ajudat a arribar fins aquí.

En primer lloc desitjo i és de justícia, agrair aquest treball a les meves directores de tesis, Susana Buxaderas i Elvira López sense les quals aquest projecte no s'hauria portat a terme. Tot i la manca de temps de totes nosaltres, sempre hi ha coses més importants o més urgents a fer, han tingut un moment per donar-me consells en l'experimental, les publis i tot el que ha fet falta. A més s'han convertit en grans amigues i prometo que no oblidaré cap dels nombrosos consells que m'han donat no només de ciència si no de la vida en general. En cap altre lloc hauria après tant!!!

També voldria donar les gràcies a la resta de persones amb les quals he compartit aquests anys al departament. Primer de tot a la Doctora de la Torre que amb la seva presència constant sempre ha demostrat tenir-me més confiança que la que a vegades em tinc jo mateixa. També les Doctores Rosa Lamuela i Cristina Andrés que també formen part del grup de vins i amb qui hem compartit nombroses estones.

No puc deixar de recordar en aquests moments els amics del grup de vins i d'aromes i anàlisi sensorial al Joan (ara et tocarà a tu) i de forma molt especial a la Paqui (sense la qual no hauria acabat mai els suc), la Lulú (sin ti no tendria portada entre otras cosas), l'Stefania (por un millón de cosas), la Mercè (per la confiança) per tots els grans moments no només al laboratori si no també a l'escala, als dinars, als cafès, excursions a la Illa i els incomptables pica-pica. Tampoc vull oblidar-me de la resta de gent del laboratori Elena, Mireia, Raul, Ana...I la gent d'altres grups Mari Luz, Tommaso, Marcos, Ricard (sento que els alumnes de pràctiques t'hagin martiritzat tan), Alba, Gema, i sobretot al meu company d'aventures amb la paperassa el Jose, si acabes abans que jo no em facis cap pregunta... i també la resta de gent dels altres grups.

Tampoc puc oblidar els meus inicis al laboratori i les companyes de fatigues sobretot la resta de víctimes dels polisacàrids Magda López Barajas (que tinguis

molta sort en tot el que facis), la Mar (companya incansable amb l'HPLC) i la resta de companyes amb qui vam compartir hores i hores d'experimental: Teresa, Maite, Valentina (juntas iniciamos los zumos), Giovanna, Marita, Sònia F., Neus, i també gent d'altres grups Eva, Sònia N., Chus i tants altres que no cito per no deixar-me ningú... molta sort a tots!

A tots els professors del departament, alguns companys de pràctiques i per la confiança en creure que podia ser coordinadora de pràctiques, l'Ana Isabel per la paciència amb els aparells (sobretot l'IR, quina creu) i a la Montse Aymamí per la paciència amb la paperassa i al Fernando per tantes coses sobretot les pràctiques (al final sempre ho acabo tenint tot, encara que sempre em facis patir) i els ordinadors.

A les bodegues col·laboradores, Grup Freixenet S.A. per la seva disponibilitat i oportunitat d'obtenir els caves a escala industrial.

Finalment agrair molt especialment a la meva família, la Nuri i en Pere per aguantar els millors i els pitjors moments d'aquesta etapa amb molta paciència. Als amics de fora del departament, encara que no sempre han entès què feia anant cada dia a Barcelona i què carai feia jo a la Universitat i encara que pensin que aquí vivim molt bé no sempre és així. A en Jordi que ha estat el company que ha compartit tota aquesta tesis i per tan també és una miqueta seva.

**MOLTES GRÀCIES A TOTS!!!**

*Als meus pares, la Nuri i a en Jordi*

---

<b>1 INTERÉS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS</b> .....	<b>6</b>
2.1 LEGISLACIÓN Y DATOS DE PRODUCCIÓN .....	6
2.1.1 <i>Bebidas analcohólicas derivadas de fruta</i> .....	6
2.1.2 <i>Bebidas alcohólicas derivadas de fruta: vino y cava</i> .....	9
2.2 FACTORES DE CALIDAD DE FRUTA Y PRODUCTOS DERIVADOS .....	12
2.2.1 <i>Caracterización aromática de bebidas analcohólicas derivadas de fruta</i> ..	14
2.2.2 <i>Caracterización aromática de bebidas alcohólicas derivadas de fruta</i> .....	17
2.3 DETERMINACIÓN DE VOLÁTILES .....	20
2.3.1 <i>Microextracción en Fase Sólida (SPME)</i> .....	21
2.3.1.1 Procedimiento .....	23
2.3.1.2 Fundamentos teóricos de la SPME .....	29
2.3.1.3 Variables que afectan el proceso de SPME .....	30
2.3.1.3a Etapa de extracción .....	31
2.3.1.3b Etapa de desorción .....	41
2.3.2 <i>Aplicaciones de SPME en alimentos</i> .....	43
2.4 CARACTERIZACIÓN DE POLISACÁRIDOS .....	52
2.4.1 <i>Antecedentes bibliográficos</i> .....	53
2.4.2 <i>Relación aromas con polisacáridos</i> .....	57
<b>3 METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>63</b>
3.1 PRIMERA PARTE. CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA POR SPME .....	64
3.1.1 <i>Aplicación de HS/SPME en zumos y néctares de fruta comerciales</i> .....	64
3.1.2 <i>Aplicación de HS/SPME en vinos espumosos o cavas</i> .....	65
3.2 SEGUNDA PARTE: EFECTO DE LOS POLISACÁRIDOS SOLUBLES SOBRE LOS VOLÁTILES .....	67
3.2.1 <i>Determinación de los polisacáridos por Gel Permeación</i> .....	68
3.2.1.1 Aplicación a zumos y néctares comerciales .....	69
3.2.1.2 Aplicación a mosto de uva .....	69
3.2.2 <i>Efecto de los enzimas pectolíticos sobre la composición volátil</i> .....	70

---

<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>74</b>
4.1 PRIMERA PARTE: CARACTERIZACIÓN AROMÁTICA POR HS/SPME Y GC/MS.....	74
4.1.1 <i>Caracterización de compuestos volátiles de zumos de fruta y néctares por HS/SPME y GC/MS</i> .....	75
4.1.2 <i>Desarrollo de los compuestos volátiles del cava (vino espumoso) durante largo tiempo de envejecimiento en contacto con las levaduras</i> .....	78
4.2 SEGUNDA PARTE: EFECTO DE LOS POLISACÁRIDOS SOLUBLES SOBRE LOS VOLÁTILES .....	80
4.2.1 <i>Caracterización de los polisacáridos de zumos y néctares de fruta convencionales y biológicos</i> .....	81
4.2.2 <i>Influencia del rendimiento productivo y el índice de maduración sobre los polisacáridos y otros componentes del zumo de uva</i> .....	83
4.2.3 <i>Evaluación de la composición volátil de zumos de albaricoque, melocotón y pera según dos tratamientos pectolíticos</i> .....	85
<b>5 COMENTARIOS A LOS RESULTADOS</b> .....	<b>88</b>
5.1 PRIMERA PARTE: CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN BEBIDAS DERIVADAS DE FRUTA POR HS/SPME .....	88
5.1.1 <i>Bebidas analcohólicas</i> .....	89
5.1.2 <i>Bebidas alcohólicas</i> .....	94
5.2 SEGUNDA PARTE: INFLUENCIA DE LOS POLISACÁRIDOS SOBRE LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL ..	100
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>105</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>108</b>



## **1 Interés y objetivos**

## 1 Interés y objetivos

La calidad de un producto alimenticio se define como las características y rasgos relacionados con su capacidad para satisfacer necesidades explícitas o implícitas (ISO 8402:1994). Dentro de estas características se pueden incluir las propiedades sensoriales, el valor nutritivo, los constituyentes químicos, las particularidades mecánicas y funcionales, y los defectos de un producto.

Sin embargo, según Abbott (1999) los atributos que más condicionan la aceptabilidad del alimento por parte del consumidor son los relacionados con la calidad sensorial u organoléptica, que incluye la apariencia, la textura, el aroma y el gusto. En este sentido, uno de los rasgos organolépticos más complejos y determinantes de la calidad sensorial es el aroma del alimento, que se puede definir como la sensación global producida por los compuestos que interactúan con las terminaciones nerviosas sensitivas del gusto y del olfato (Cacho, 2003). El aroma está compuesto por centenares de compuestos volátiles y semivolátiles que pertenecen a distintas familias químicas y que se encuentran en muy variable concentración (Ruiz y Martínez, 1997). La elevada producción y la necesidad de encontrar alimentos aromáticamente estandarizados, requieren herramientas analíticas eficientes para la caracterización. No obstante, el umbral de percepción de las sustancias que condicionan el aroma puede variar desde  $\mu\text{g/L}$  a  $\text{mg/L}$ , pero no necesariamente por encontrarse en mayor concentración su incidencia será mayor. En este sentido, el impacto sensorial suele estar relacionado con las interacciones entre compuestos volátiles y, entre éstos y otros componentes que actúan como medio de soporte. Así pues, uno de los principales problemas de la determinación de la fracción aromática es la dificultad para encontrar un método que sea a la vez útil para la valoración cualitativa y cuantitativa. Además, al estudiar las sustancias que inciden en el aroma se requiere habitualmente un paso previo para aislar los compuestos de interés de los constituyentes mayoritarios de la matriz. Esto implica en muchos casos,

procedimientos largos y laboriosos que muchas veces cursan con pérdida de analitos y/o con la aparición de artefactos.

España dentro de la Unión Europea, es junto a Italia, uno de los principales países productores de fruta gracias a su clima mediterráneo. Además de una gran producción, 11 millones de toneladas en el año 2002 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA), también existen múltiples empresas transformadoras, entre las cuales destacan las que se dedican a la elaboración de bebidas derivadas de fruta. Según el Código Alimentario Español (CAE) las bebidas se clasifican en tres categorías: las analcohólicas, las alcohólicas y el agua. Dentro del grupo de las bebidas analcohólicas, los hábitos alimentarios se orientan hacia productos más cómodos y saludables. Esto ha favorecido el consumo de zumos de fruta, cuyo sector ha constatado un aumento en las ventas del 14% en el año 2004. Otro dato a tener en cuenta, es que en España se bebe una media anual per cápita de 20 a 21L de zumos, lo que puede ser en parte debido al fácil acceso a la fruta (Galindo, 2004). Dentro del grupo de bebidas alcohólicas, el vino es la bebida alcohólica derivada de fruta con mayor producción y consumo. La Unión Europea ocupa un lugar preponderante en el mercado vitivinícola mundial, representando un 65% de la producción de todo el planeta. España, sigue a Italia y Francia en la manufactura de productos derivados de la uva, como el vino. Según datos de consumo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el vino de calidad elaborado en una región determinada (v.c.p.r.d.) es el tipo de vino que más ha aumentado del 2003 al 2004, un 13.6 %.

Por tanto, estos datos confirman la importancia económica y social de las bebidas derivadas de fruta, ya sean zumos y néctares o bien vino. Sin embargo, para mantener estos índices positivos de producción y consumo, es vital mantener e incluso poder aumentar su calidad. Para la industria el aroma es uno de los atributos más valorados, no sólo para asegurar la aceptación por parte del consumidor sino para evaluar la calidad (Flores, *et al.*, 2005). Además, uno de los problemas a los que

se enfrenta la legislación comunitaria actual sobre zumos (Directiva (EC) 112/2001) es que no establece parámetros analíticos para determinar la autenticidad de los productos. Este vacío legal provoca que algunas empresas aprovechen esta carencia para envasar productos de escasa calidad. La definición de los parámetros de calidad organoléptica de las bebidas derivadas de fruta, es pues de gran interés tanto para los organismos legislativos como para el sector productor y elaborador. Por esto, y con el fin de profundizar en algunos parámetros de la calidad aromática de bebidas analcohólicas y alcohólicas derivadas de fruta, este estudio se plantea como objetivo general determinar la composición volátil que caracteriza zumos, néctares y vino.

En este sentido, los objetivos concretos de este trabajo son:

1- Caracterizar la composición volátil de bebidas alcohólicas y analcohólicas derivadas de fruta, mediante un método analítico que sea útil como herramienta para controlar la calidad aromática de los productos procesados.

2- Estudiar cómo influye la composición polisacáridica en los volátiles de las bebidas, ya que los polisacáridos pueden actuar como soporte de las sustancias que repercuten en el aroma.

## **2 Antecedentes bibliográficos**

## 2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Los antecedentes bibliográficos que se han incluido en esta memoria, pretenden revisar la información sobre los compuestos volátiles de las frutas y ofrecer una versión actualizada. En este grupo de compuestos intervienen numerosas sustancias de propiedades químicas muy diversas, que se encuentran en concentraciones muy variadas y que interaccionan con otros componentes de la matriz, como los polisacáridos. Estas circunstancias dificultan, en gran medida, su determinación analítica.

### 2.1 Legislación y datos de producción

La legislación en vigor (B.O.E. nº 184, 29970-74, 2003; Reglamento CE Nº1493/1999; BOE 189278:37587-93, 1991) define y regula las características de elaboración, comercialización y distribución de los productos derivados de frutas, en especial aquellos que son objeto de este estudio, zumos, néctares y vino vcpd.

#### 2.1.1 Bebidas analcohólicas derivadas de fruta

En el B.O.E. nº 184, 29970-74 de 2003, se define el zumo de frutas como el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de la fruta de la que procede. A su vez, el néctar se describe como el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares y/o miel a los zumos de frutas, al puré o a una mezcla. La adición de azúcares y/o miel se autoriza en una cantidad no superior al 20% del peso total del producto acabado.

En la Figura 2.1 se muestra un esquema del proceso de transformación más habitual de zumos procedentes de frutas no cítricas. En rojo se resaltan las

operaciones dependientes del tipo de fruta y se señalan con interrogantes las etapas opcionales de fabricación.

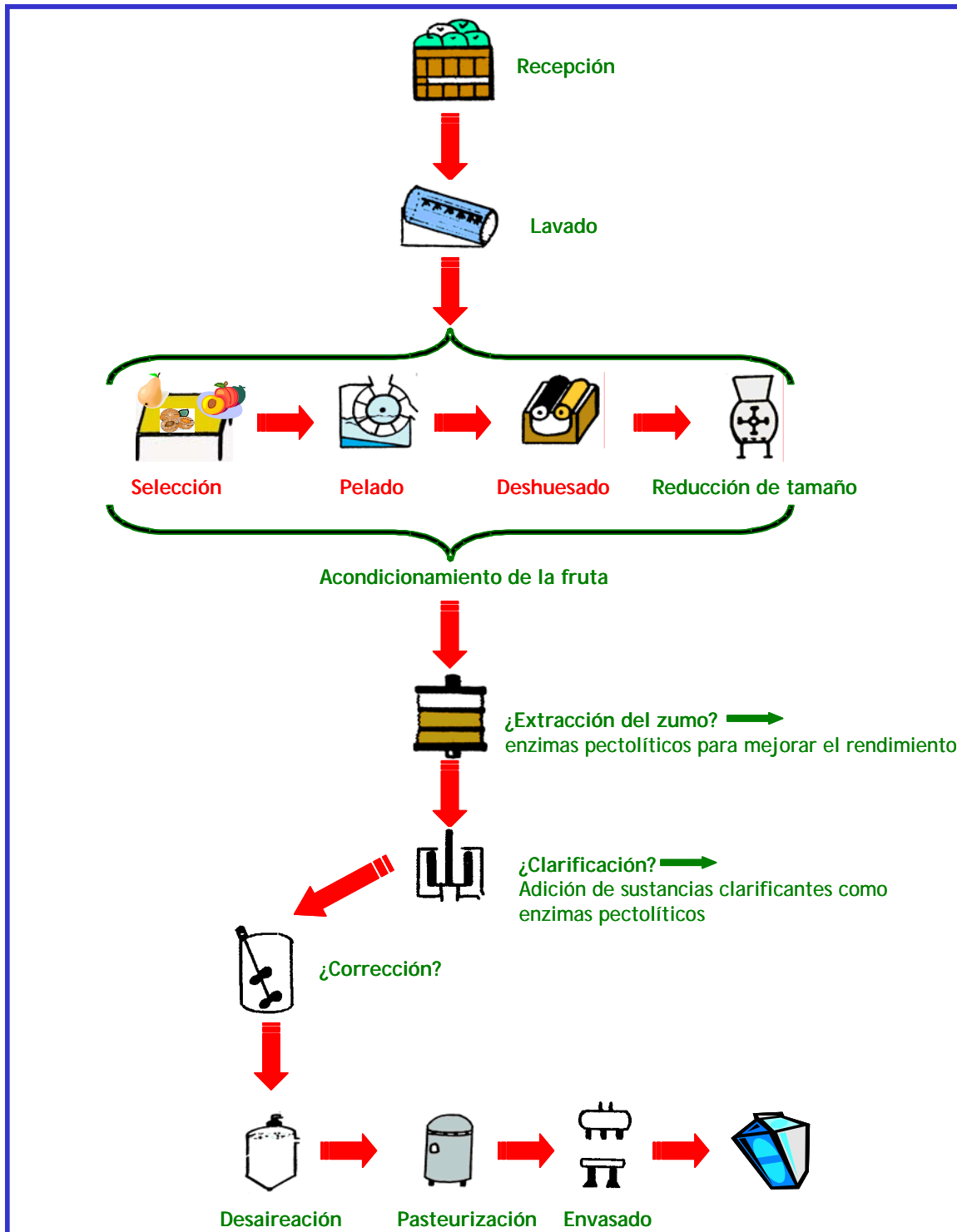
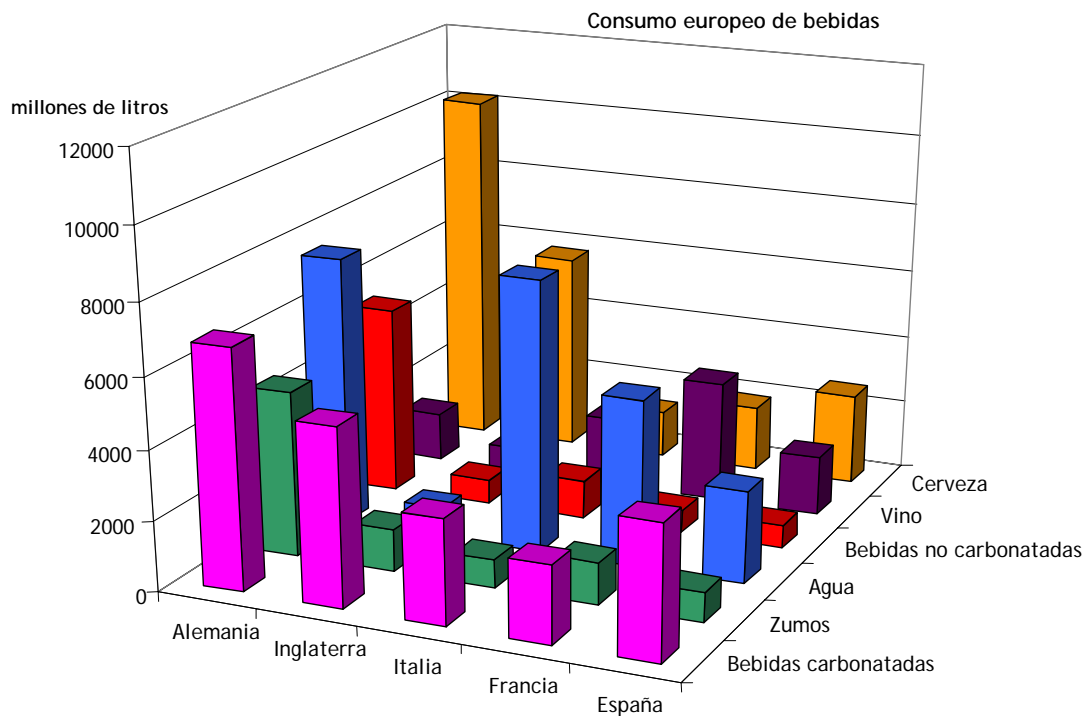


Figura 2.1: Esquema general de la elaboración de zumos.

En la Figura 2.2 se muestran los millones de litros de bebidas comercializados en 1998 en 5 países europeos y que se presentaron en la Feria Mundial de la Técnica

para las Bebidas *Drinktec-interbrau* celebrada en Munich 2001. Con respecto a las bebidas analcohólicas, en España el agua y las bebidas carbonatadas son las de consumo mayoritario, datos similares al resto de la comunidad europea, sólo superados por Alemania



**Figura 2.2:** Consumo de bebidas en diversos países de la Unión Europea basados en datos de comercialización.

En referencia a los datos de zumos de fruta, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), en el año 2003 hubo un consumo de zumos industriales de 20 a 21L *per cápita* y se reflejó un aumento del 3.3% de las ventas (Galindo, 2004). En cambio, según la Asociación Española de Fabricantes de Zumos (ASOZUMOS), el incremento ese año fue muy superior, 7% para los zumos y 17% para los néctares. En la interpretación de estos datos hay que tener en cuenta que en España hay fácil acceso a la fruta lo que, por un lado, facilita la obtención de zumos frescos en casa o en la restauración, pero por otro dificulta el control del consumo



de zumos. Durante un tiempo pareció que el mercado estaba saturado, motivo que impulsó a la industria a realizar un gran esfuerzo para desarrollar otros productos más novedosos, con valores nutricionales añadidos como los enriquecidos, vitaminados, naturales,.... Por eso, el grupo cuya producción más está creciendo es el de los zumos funcionales, o bien aquellos que incorporan frutas exóticas; así y todo los "clásicos" resisten, siendo el zumo de melocotón el de mayor consumo, un 30% del total.

### 2.1.2 Bebidas alcohólicas derivadas de fruta: vino y cava

España cuenta con una gran tradición vitivinícola lo que ha permitido producir gran diversidad de vinos de gran calidad, personalidad y prestigio mundialmente reconocido. Con el fin de reglamentar la calidad y de proteger la producción se crearon las Denominaciones de Origen (D.O.); actualmente en España existen 57 D.O., entre las que se incluye la Denominación Cava, ampliamente extendida por el territorio nacional, aunque el 98% se produce en el Penedès. Se entiende que los vinos pertenecientes a las D.O. ofrecen una indicación de calidad ligada a una zona geográfica de producción (v.c.p.r.d.: vinos de calidad producidos en una región determinada).

Según la legislación europea (Reglamento CE N°1493/1999 del consejo por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola), el mosto de uva es el producto líquido obtenido de uva fresca de manera natural o mediante procedimientos físicos cuyo grado alcohólico volumétrico adquirido sea igual o inferior al 1% Vol. Mientras que se define el vino como el producto obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva. El Cava, es un vino espumoso de calidad elaborado en una región determinada siguiendo el método tradicional o método *champenoise* (Figura

2.3) que se caracteriza por una segunda fermentación que tiene lugar en la misma botella que finalmente llegará al consumidor y un proceso de envejecimiento en contacto con las lías, que transcurre durante un período legal mínimo de nueve meses (BOE 189278:37587-93, 1991).

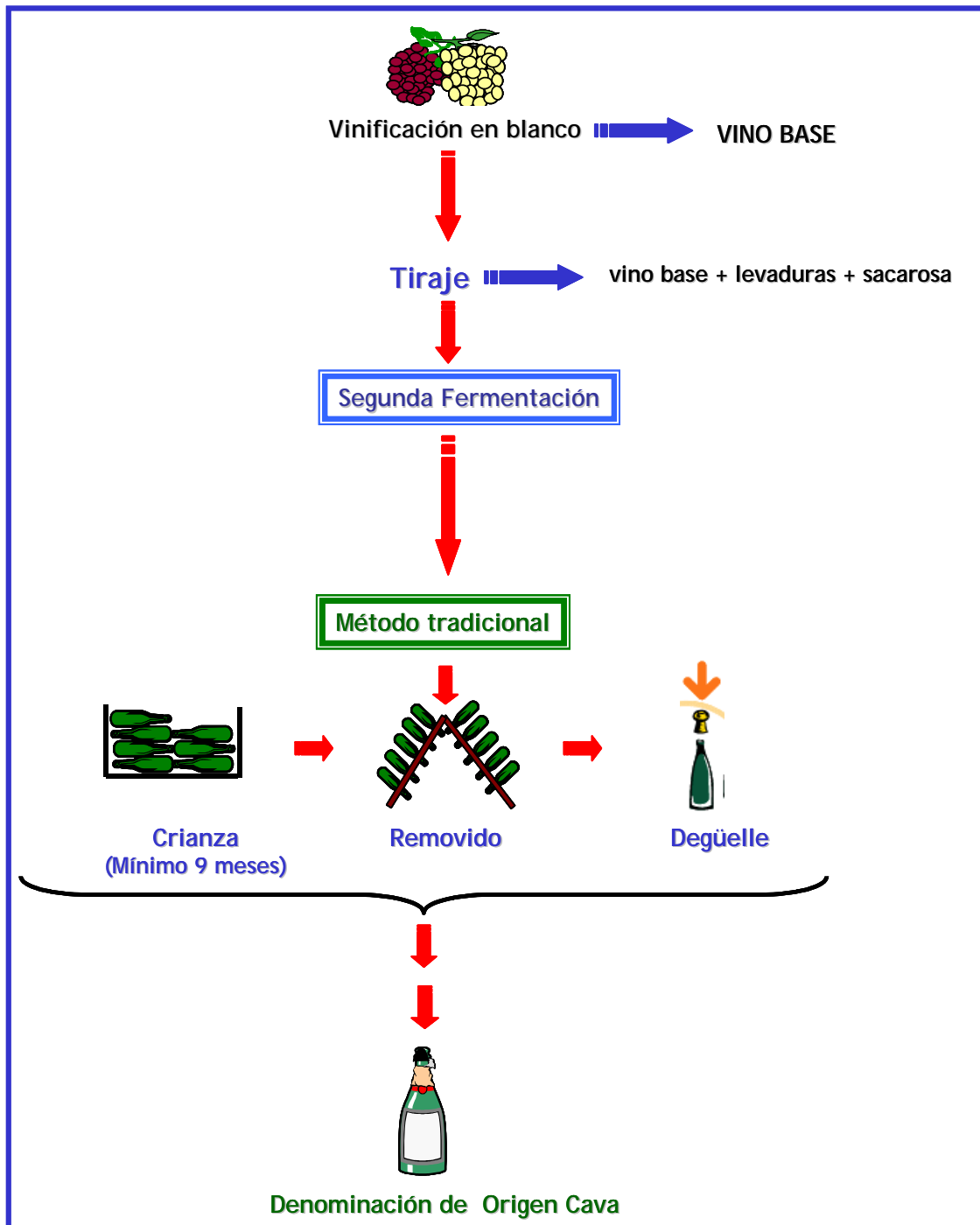
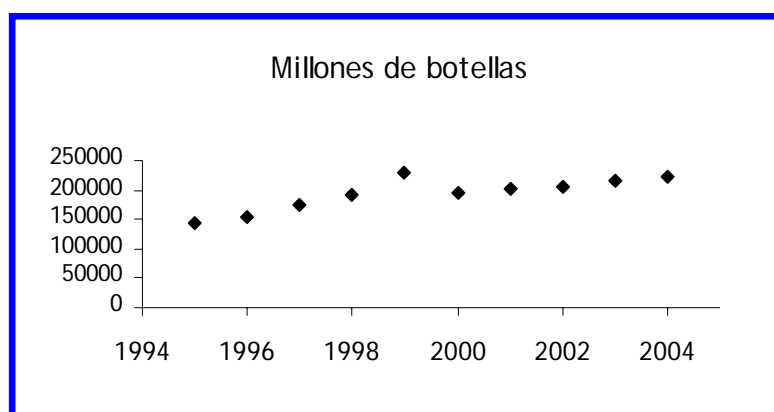


Figura 2.3: Esquema del proceso de elaboración del cava mediante el método tradicional.

Según datos de la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB, 2001), la tendencia general del mercado es una mayor demanda de vinos de calidad en detrimento del vino joven de mesa. Por esta razón, se ha exportado menor volumen de vino, pero el producto ha sido de mayor calidad y precio más elevado. También, según datos de la Federación Española del Vino, la producción vitivinícola ha crecido fuertemente en España coincidiendo con la recuperación de los principales competidores, Italia y Francia, después de un descenso en la última década. En lo que se refiere al consumo, el 2004 ha mejorado respecto de los últimos 17 años en los cuales había disminuido progresivamente, sobretodo en lo referente al vino de mesa (-0.3%), disminución que no ha sido compensada por el aumento de los vinos con denominación de origen (13.6%).

En España un 81.4% de la producción de vinos espumosos corresponden a Cava (Datos aportados por Freixenet S.A citados en Buxaderas y López-Tamames, 2003). La región del Cava produce anualmente más de 200 millones de botellas en un mercado que está en constante expansión. De los últimos 10 años, sólo el pasado 2000 se produjeron menos botellas que en el año anterior, según datos del Consejo Regulador del Cava (Figura 2.4).



**Figura 2.4:** Evolución de la producción de botellas de cava según datos del Consejo Regulador del Cava.

## 2.2 Factores de calidad de fruta y productos derivados

La composición de las frutas depende en gran medida del tipo de fruto, de la variedad y de su madurez. Factores geográficos, estacionales, diferencias en la maduración, así como las condiciones del procesado influirán en la composición tanto de frutas como de sus transformados (Versari *et al.*, 2002).

Producto	Nombre científico	Tipo de fruto	Usos
Uva	<i>Vitis vinifera</i> ssp. <i>vinifera</i>	Baya	fresca, pasa, vino, zumo, aguardiente
Melocotón	<i>Prunus persica</i>	Drupa	fresco, desecada, compota, zumo, en almíbar, mermelada, licor
Albaricoque	<i>Prunus armeniaca</i>	Drupa	fresco, desecado, zumo, compota, mermelada, licor
Pera	<i>Pyrus communis</i>	Pomo	fresca, desecada, en almíbar, compota, confitada, licor, zumo

**Tabla 2.1:** Características botánicas y usos de las frutas de este estudio (Belitz y Grosch, 1988).

En general, la materia seca de la fruta supone entre un 10 y un 20% de su peso. Como componentes principales contienen agua, azúcares, polisacáridos y ácidos orgánicos, mientras que son escasos los lípidos y compuestos nitrogenados. Además, son importantes, por su valor sensorial, componentes cuantitativamente secundarios como pigmentos y compuestos aromáticos y, por su valor nutritivo, las vitaminas y minerales (Belitz y Grosch, 1988).

La glucosa y la fructosa suelen ser los monosacáridos mayoritarios en las frutas (Versari *et al.*, 2002), presentando valores muy variables; mientras que la sacarosa es el disacárido mayoritario, excepto en algunas frutas, como la uva, donde prácticamente no se encuentra. Los polisacáridos presentes en las frutas son celulosas, hemicelulosas, pentosanos y pectinas, siendo estas últimas las que más varían durante el proceso de maduración.

Los ácidos orgánicos de los pomos y drupas son principalmente ácido málico, mientras que las bayas tienen como ácido principal el cítrico, excepto la uva que está compuesta mayoritariamente por ácido tartárico (Belitz y Grosch, 1988).

Uno de los productos transformados más tradicionales son los zumos naturales de fruta (100% fruta) y los néctares, cuya formulación debe cumplir unos requisitos de acuerdo a la legislación vigente (B.O.E. nº 184, 29970-74, 2003). Las cantidades mínimas de puré o zumo que deben contener los néctares se especifican en la **Tabla 2.2**.

Formulación de néctares	Fruta	Contenido mínimo de puré o zumo (% del volumen del producto acabado)
Frutas de zumo ácido no consumible en estado natural	Albaricoque	40
Frutas de zumo comestible en estado natural	Melocotón	50
	Pera	50

**Tabla 2.2:** Contenido mínimo de fruta en los néctares según la legislación vigente (BOE nº184).

Algunos compuestos, como azúcares, ácidos orgánicos y fenoles, pueden ser utilizados como marcadores para evaluar el proceso de elaboración y vida útil, así como la autenticidad de los productos derivados (Versari *et al.*, 2002). El agricultor se preocupa fundamentalmente de los atributos de aspecto, tamaño, forma, color, carencia de defectos y de las enfermedades que pueden mermar la cosecha. El industrial, sin embargo, debe tener esto en cuenta, pero también le confiere importancia a otros valores como la textura y la calidad del aroma.

Las propiedades organolépticas de los productos derivados de la uva también dependen de numerosos factores: de la cepa de uva, de las condiciones climáticas, del tipo de suelo, y en el caso del vino y el cava, de los tratamientos pre y post-fermentativos. La suma de todos estos agentes contribuye de forma decisiva a las características organolépticas del vino y del cava. Este último adquiere su particular

*bouquet* durante la fase de rima. Esta fase consiste en un proceso de envejecimiento en contacto con las levaduras, durante el cual, tienen lugar una serie de cambios bioquímicos y de intercambio entre el vino espumoso y las lías (Ver Figura 2.3, del apartado 2.1.2). La legislación marca las características analíticas que deben cumplir el cava y el vino base destinado a su elaboración (B.O.E. 189278:37587-93, 1991) (Tabla 2.3). Sin embargo, estos parámetros de control están más relacionados con una calidad definida por parámetros higiénico-sanitarios que por atributos sensoriales.

Parámetros de calidad	Vino base	Cava
Graduación alcohólica adquirida	9.5% - 11.5%	10.8% - 12.8%
Acidez total mínima (ácido tartárico)	5.5 g/L	5.5 g/L
Extracto seco no reductor	13 g/L - 22 g/L	13 g/L - 22 g/L
Acidez volátil real (ácido acético)	< 0.60 g/L	< 0.65 g/L
Anhídrido Sulfuroso total	< 140 mg/L	< 160 mg/L
Cenizas	0.7 g/L - 2 g/L	0.7 g/L - 2 g/L
PH	2.8 - 3.3	2.8 - 3.3
Sobrepresión mínima de CO <sub>2</sub> (20°C)	-	3.5 bar

Tabla 2.3: Características analíticas de los vinos base y cavas según la legislación vigente (BOE nº189278:37587-93).

### 2.2.1 Caracterización aromática de bebidas analcohólicas derivadas de fruta

El aroma de los alimentos constituye un criterio importante de calidad (Horvat *et al.*, 1990; Robertson *et al.*, 1990), ya que es uno de los factores determinantes para la aceptación del producto por el consumidor. Está formado por numerosas sustancias aunque sólo se consideran aquellas cuya cuantía es superior a su **concentración umbral**, que es la cantidad más baja de un compuesto que puede ser directamente reconocido por su olor o sabor.

A los componentes particularmente responsables del aroma característico de un alimento se les denomina **compuestos impacto** (*character impact compound*). De

acuerdo con la presencia de estas sustancias clave Belitz y Grosch (1988) distinguen cuatro grupos:

- Grupo I: el aroma es debido de modo decisivo a un solo compuesto. La presencia de otras sustancias aromáticas sólo sirve para matizar el aroma característico que se percibe del alimento.
- Grupo II: varios compuestos, de los cuales uno juega un papel principal, crean o determinan el aroma típico del alimento.
- Grupo III: el aroma sólo se puede reproducir con gran fidelidad gracias a un gran número de compuestos. Ordinariamente no está descrito ningún compuesto impacto.
- Grupo IV: el aroma del alimento no se puede reproducir fielmente, ni utilizando gran número de compuestos volátiles.

El perfil aromático característico de las frutas depende de una mezcla compleja de compuestos químicos (e-book: <http://alfa.ist.utl.pt>) que se va formando durante la maduración del fruto, a través de distintas rutas bioquímicas a partir de precursores de las plantas (Gómez y Ledbetter, 1997). El desarrollo de los aromas en las frutas tiene lugar durante el climaterio, que es el periodo eficaz del proceso madurativo. Pequeñas cantidades de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y aminoácidos se catabolizan y dan lugar a distintos compuestos volátiles. La velocidad de formación de estas sustancias aumenta después del inicio del climaterio y el proceso continúa tras la recolección de la fruta hasta que comienza la senescencia (Arthey y Ashurst, 1997). Las frutas y hortalizas contienen sustancias aromáticas procedentes del metabolismo secundario de las plantas. En muchas familias de plantas que no están relacionadas entre si, se revelan características aromáticas comunes, de manera que, a pesar de la diversidad, en las células de la mayoría de

los vegetales opera un sistema común de rutas metabólicas que genera diferencias cuantitativas más que cualitativas.

En la madurez la fruta logra el flavor óptimo, pero se vuelve muy vulnerable al deterioro. La escasa capacidad de conservación de las frutas frescas ha llevado a desarrollar una serie de procedimientos para alargar su vida comercial en las mejores condiciones. El procesado alarga su durabilidad, pero implica cambios estructurales importantes que, además, llevan consigo modificaciones de las características organolépticas. Por ello, Rizzolo *et al.* (1992) indican que para mantener la calidad organoléptica es importante saber de qué modo los distintos tratamientos influyen en la composición de volátiles.

La mayoría de trabajos que se encuentran en la bibliografía sobre el aroma de frutas no cítricas, como albaricoque, melocotón y pera, se ha realizado sobre la fruta, no sobre el zumo. En el caso del melocotón y del albaricoque, el aroma viene definido por un amplio grupo de compuestos. Concretamente, en el aroma del melocotón se han identificado hasta 100 compuestos, de los cuales las lactonas, especialmente  $\gamma$ -decalactona, y  $\delta$ -decalactona (Horvat y Chapman, 1990; Robertson *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1991; Derail *et al.*, 1999; Aubert *et al.*, 2003), se han descrito como compuestos impacto, aunque actúen en asociación con aldehídos y alcoholes de 6 átomos de carbono, y terpenos (Rizzolo *et al.*, 1995; Visai y Vanoli, 1997).

El albaricoque es una drupa muy apreciada por el consumidor, gracias a su flavor, dulzor y jugosidad, aunque su aroma varíe dependiendo de la variedad (Guillot *et al.*, 2005) y del grado de maduración (Botondi *et al.*, 2003). En este caso, no existe un único compuesto impacto, sino que predominan diferentes familias: terpenoles, ésteres, lactonas, compuestos  $C_6$ , aldehídos fenólicos y cetonas sesquiterpénicas (Chariote *et al.*, 1981; Guichard y Souty, 1988; Botondi *et al.*, 2003). Al contrario, Takeoka *et al.* (1990), señala que los principales compuestos que



contribuyen al aroma del albaricoque son la  $\beta$ -ionona y el linalool responsables del carácter floral; la  $\gamma$ -decalactona y la  $\gamma$ -octalactona que confieren aroma frutal a melocotón y un trasfondo a coco; y por último, el  $\beta$ -ciclocitral y el fenilacetaldehído (Guichard *et al.*, 1990 y Takeoka *et al.*, 1990). En un trabajo reciente (Guillot, *et al.*, 2005), se han descrito más de 200 compuestos aromáticos que participan en las notas afrutadas, florales y herbáceas de distintas variedades de albaricoque, de los cuales 23 son comunes a todas las variedades y de éstos, 10 pueden actuar como discriminantes para caracterizar los distintos cultivos (acetato de etilo, acetato de hexilo,  $\beta$ -ciclocitral,  $\gamma$ -decalactona, limoneno, 6-metil-5-hepten-2-ona, linalool,  $\beta$ -ionona, mentona, (*E*)-hexen-2-al).

En lo que respecta al aroma de la pera (*Pyrus communis*), éste forma parte del grupo I de la clasificación de Belitz y Grosch (1988) anteriormente descrita. Es decir, está principalmente definido por un único compuesto impacto. En este caso, es el trans-2-cis-4-decadienoato de etilo, mientras que el acetato de hexilo sólo sirve para matizar las notas aromáticas (Suwanagul y Richardson 1998a y 1998b).

### 2.2.2 Caracterización aromática de bebidas alcohólicas derivadas de fruta

El aroma del vino es muy complejo porque depende de transformaciones biológicas, bioquímicas y tecnológicas y no sólo es debido a la fermentación (e-book: <http://alfa.ist.utl.pt>). Según Ferreira (2002), el aroma de los distintos vinos está compuesto por más de 800 compuestos de los cuales, sólo unos 50 contribuyen decisivamente al aroma. Esta cincuentena de compuestos, pueden clasificarse en distintas categorías:

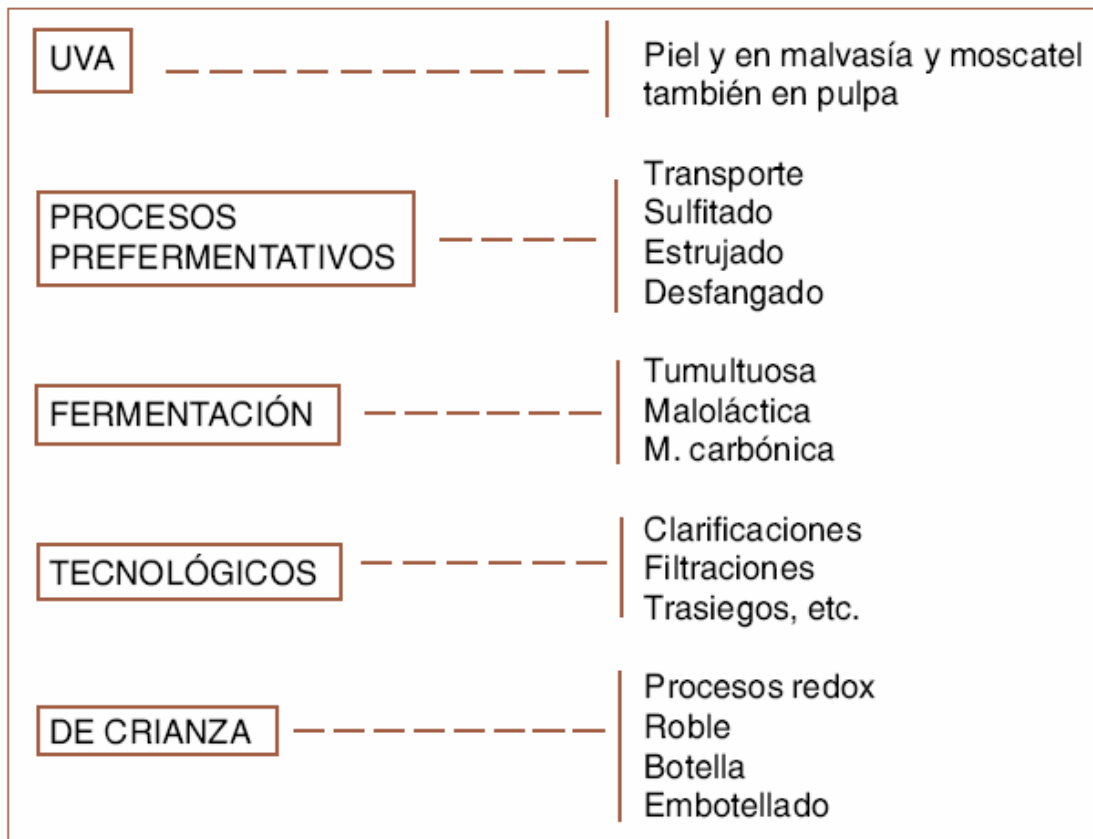
★ Aroma base: formado por aromas que están en todos los vinos en concentraciones apreciables y que constituyen el tronco aromático-gustativo. Son los

alcoholes de fusel y sus acetatos (isobutílico, isoamílico y feniletílico), metionol, ácidos grasos, esterres etílicos, acetaldehído, diacetilo y  $\beta$ -damascenona.

★ notas sutiles: componentes que estando en todos los vinos, sólo a veces su concentración supera el valor umbral y nunca llega a ser un aroma prominente. Ejemplos: guaiacol, vinilguaiacol, eugenol.

★ notas impacto: componentes que sólo se encuentran en determinados vinos y su impacto sensorial es tan intenso que diferencian a este vino del resto. Ejemplos: linalool en vinos moscatel, el óxido de nerol en Gewürztraminer o la 4-metil 4-mercaptopentanona en Sauvignon blanc.

Sin embargo, lo más usual es clasificar los aromas del vino en función de la etapa en la que se forman. El aroma puede provenir de la uva, es el llamado *aroma primario* [que incluye dos subcategorías el **varietal** (compuestos volátiles libres presentes en la uva, dependerá de la variedad de uva utilizada y sus características) y el **prefermentativo** (aromas que se liberan de su combinación con otras sustancias llamadas precursores debido a la actividad enzimática provocada por la tecnología aplicada)]; de la levadura, es el *aroma secundario* que se desarrolla durante la primera fermentación ligado a la presencia de ciertos tipos de enzimas, este es el aroma mayoritario; y finalmente el *aroma terciario* o **post-fermentativo** que se forma durante la crianza. Este último se desarrolla mediante reacciones químicas y/o bioquímicas a partir de aromas de etapas anteriores. Según Ruíz y Martínez (1997) en la etiología del aroma del vino inciden múltiples factores que se detallan en el cuadro 2.1.



Cuadro 2.1: Factores que influyen en la formación de los distintos tipos de aromas del vino, según Ruíz y Martínez (1997).

Como se ha mencionado anteriormente, el aroma de los cavas, el *bouquet*, se desarrolla principalmente durante la fase de rima cuando el cava envejece en contacto con las levaduras. Para obtener cavas de alta gama comercial son habituales períodos de envejecimiento entre 18 y 24 meses, a pesar que según la legislación existente, nueve meses de envejecimiento son suficientes para que un vino espumoso sea considerado cava (Reglamento CE N°1493/1999). Mientras que algunos autores consideran que el desarrollo del aroma se debe principalmente a la presencia de las levaduras y su autólisis (Feuillat y Charpentier, 1982; Silva *et al.*, 1988; Nicolosi Asmundo *et al.*, 1995), otros consideran que la presión de CO<sub>2</sub> y la temperatura de la bodega son los principales condicionantes (Usseglio-Tomasset *et al.*, 1983; Margheri *et al.*, 1984).

### 2.3 Determinación de volátiles

Los aromas son esenciales para la evaluación de la calidad de los productos frescos y procesados. La determinación de los compuestos volátiles es uno de los retos con más dificultad en el análisis de alimentos, debido que es necesario determinar diversidad de compuestos en precaria concentración y de características físico-químicas distintas. Por su condición volátil, el instrumental analítico que se requiere para su detección y separación es un cromatógrafo de gases. Sin embargo, las distintas técnicas propuestas se distinguen por la preparación de la muestra, la extracción, el aislamiento y la concentración de los analitos, etapas previas a la cromatografía de gases, y que repercuten en la reproducibilidad y precisión. Clásicamente la extracción de aromas se ha realizado por medio de métodos laboriosos, largos y/o caros, como la extracción líquido-líquido (Ferreira *et al.*, 1993; Villén *et al.*, 1995; di Cesare *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996; Gallart *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1998; Vas *et al.*, 1998; Aleixandre *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2002; Ortega-Heras *et al.*, 2002; Bonino *et al.*, 2003), la extracción sólido-líquido (Polesello *et al.*, 1989; Edwards y Beelman, 1990), el espacio de cabeza dinámico (Narain *et al.*, 1990; Salinas *et al.*, 1994; García-Jares *et al.*, 1995; Visai y Vanoli, 1997; Suwanagul *et al.*, 1998a) y la destilación al vacío (Guichard y Souty, 1988; Guichard *et al.*, 1990; Horvat *et al.*, 1990; Gómez y Ledbetter, 1997; Derail *et al.*, 1999).

La extracción líquido-líquido comprende varias fases que habitualmente provocan pérdida de analitos durante el proceso. Frecuentemente, la manipulación durante el análisis es la mayor fuente de errores. Posteriormente y para minimizar la cantidad de solvente a emplear, se desarrolló la extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction* SPE), que usa un material adsorbente para extraer compuestos orgánicos de muestras acuosas. Sin embargo, ambas técnicas requieren de una fase posterior de concentración para eliminar el exceso de disolvente, por lo que se

limitan a compuestos volátiles y semivolátiles con puntos de ebullición superiores a la temperatura de desorción del solvente. Las restricciones de la SPE (como múltiples pasos, pérdidas por evaporación, riesgo de contaminación y producción de artefactos) se superan al poner una pequeña cantidad de fase sólida en una delgada fibra de sílice fundida, lo que constituye una microextracción que permite mayor rendimiento. La pequeña geometría permite una mayor rapidez de transferencia de masa durante la extracción y desorción evitando problemas de obturación y facilitando el manejo y la introducción en los instrumentos analíticos (Zhang, *et al.*, 1994; Alpendurada, 2000).

### 2.3.1 Microextracción en Fase Sólida (SPME)

Pawliszyn y colaboradores desarrollaron en los años 90 la MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (*Solid Phase Microextraction* SPME) inicialmente usada para la determinación de compuestos clorados en aguas contaminadas (Arthur y Pawliszyn, 1990). Esta técnica de preparación de muestra, extrae y concentra los analitos directamente en una fibra o fase estacionaria que incluye un tipo o más de polímeros extractantes (Arthur y Pawliszyn, 1990; Zhang y Pawliszyn, 1993; Yang y Peppard, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Mestres *et al.*, 2000). El método es rápido, fácil de aplicar, de bajo coste y, a la vez, respetuoso con el medio ambiente, ya que no usa ningún tipo de disolvente orgánico. Se emplea combinado con cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a detector de espectrometría de masas (GC-MS) y es aplicado a un amplio rango de compuestos volátiles y semivolátiles en muestras biológicas (Ulrich y Martens, 1997), ambientales (Clark y Bunch, 1997) y de alimentos (Kataoka *et al.*, 2000; Wilkes *et al.*, 2000). El SPME se ha introducido también como técnica acoplada a cromatografía líquida (HPLC) y líquido-masas (LC-MS) para analizar compuestos poco volátiles o bien compuestos termolábiles (Kataoka *et al.*, 2000).

La técnica de SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida de 10mm, de muy pequeñas dimensiones, recubierta por un sorbente de 80-100  $\mu\text{m}$  (del orden de 0.5  $\mu\text{L}$ ; casi siempre polimérico). El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla a una jeringa. De esta forma se facilita la manipulación y se protege la fibra cuando ésta no se utiliza (Zhang, *et al.*, 1994) (Figura 2.5).

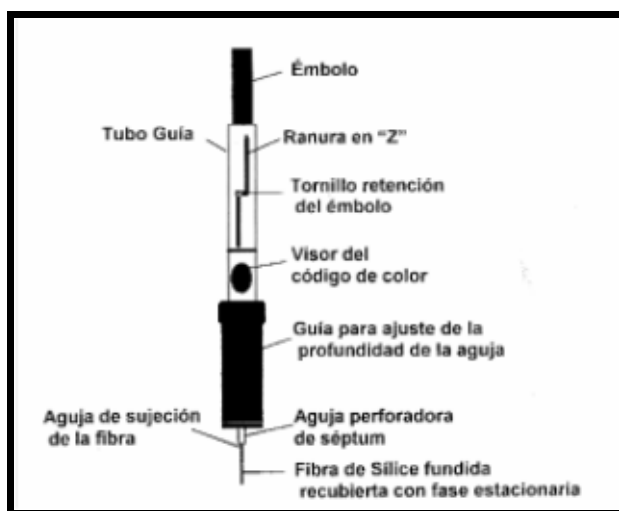


Figura 2.5: Dispositivo de SPME (Mestres *et al.*, 2000)

Las principales ventajas de la técnica de SPME son:

- Gran simplicidad
- Bajo coste
- Utiliza pequeños volúmenes de muestra
- No necesita disolventes orgánicos
- Fácilmente transportable
- Útil para todo tipo de muestras: gaseosas (Chien, *et al.*, 2000; Koziel, *et al.*, 2000 y 2001), líquidas (Constant, *et al.*, 1997; Aguilar, *et al.*, 1998; Ebeler, *et al.*, 2001; Gerecke, *et al.*, 2001; González-Toledo, *et al.*, 2002) y sólidas (Santos, *et al.*, 1997; Song, *et al.*, 1998; Simplicio, *et al.*, 1999; Cam *et al.*, 2001; Liu, *et al.*, 2001)

- Posibilidad de automatización
- Permite la concentración de compuestos volátiles y semivolátiles
- El límite de detección puede ser muy bajo (del orden de ppt) lo que demuestra la sensibilidad de esta técnica

Mientras que los principales inconvenientes son:

- ✗ Limitada capacidad de las fibras: debido a que contienen una cantidad de recubrimiento muy pequeña (Alpendurada, 2000)
- ✗ La presencia de materia suspendida en la muestra puede estropear el recubrimiento de la fibra durante la agitación. Compuestos de elevado peso molecular pueden adsorberse irreversiblemente en la fibra cambiando sus propiedades (Alpendurada, 2000)
- ✗ La formación de burbujas de gas en la superficie de la fibra puede afectar a la tasa de transferencia de masa
- ✗ Pueden aparecer problemas de sensibilidad. La sensibilidad de la técnica de SPME depende de la cantidad de analitos extraídos de la muestra; si el volumen de la muestra ( $V_s$ ) es muy elevado, será demasiado superior al producto entre la constante de distribución ( $K_{fs}$ ) y el volumen de recubrimiento ( $V_f$ ) de la fibra ( $K_{fs} \times V_f \ll V_s$ ) y, por tanto, aunque se aumente el volumen de muestra no se consigue aumentar la sensibilidad

### ***2.3.1.1 Procedimiento***

El procedimiento de la SPME consta de 2 etapas principales: una etapa de extracción y una de desorción.

#### **a) etapa de extracción**

En esta etapa se produce la migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Este proceso de extracción se

puede producir por adsorción o absorción en función del tipo de fibra utilizado. Para el proceso de extracción con SPME, se coloca un volumen de muestra en un vial herméticamente cerrado con un septum de silicona o teflón. Seguidamente se perfora el septum y se introduce la jeringa en el vial. Empujando el émbolo se expone la fibra a la muestra el tiempo previamente establecido (b). Una vez finalizado el tiempo de extracción, se devuelve la fibra al interior de la jeringa (c).

Hay tres formas de realizar la extracción de SPME (Lord y Pawliszyn, 2000):

I- Extracción por **inmersión directa** de la fibra dentro de la muestra (DI-SPME). Presenta la desventaja que disminuye mucho la vida media de la fibra y dificulta la reproducibilidad de la extracción. Es útil en el caso de querer determinar analitos semivolátiles o poco volátiles. Se puede aplicar agitación para incrementar la rapidez de la extracción. En el caso de muestras acuosas, para facilitar la agitación se requiere un flujo rápido de muestra, movimientos rápidos de la fibra o del vial, agitación o ultrasonidos. Todo esto conduce a reducir los efectos de la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción y contrarresta los pequeños coeficientes de difusión de los analitos de las matrices líquidas (Alpendurada, 2000; Pillonel *et al.*, 2002). En muestras gaseosas, la natural convección del aire es suficiente para facilitar un rápido equilibrio.

II- Extracción de **espacio de cabeza** o *headspace* (HS/SPME). En este caso (Figura 2.6), la fibra se expone a la fase gaseosa que queda por encima de la muestra y los analitos pasarán a la fase gaseosa en función de su presión de vapor. Las principales ventajas de este modo de extracción son que se alarga la vida útil de la fibra, ya que se evitan interferencias con otros componentes de la muestra, sobretudo aquéllos de elevado peso molecular. Por ello, es el tipo de extracción más utilizado para los analitos volátiles y semivolátiles. Además, permite modificar la matriz de la muestra sin dañar la fibra, por ejemplo variar el pH o añadir sal para aumentar el rendimiento de la extracción. El HS/SPME se utiliza tanto en muestras



gaseosas, como líquidas y sólidas, siendo útil en estas últimas en el caso de sedimentos, alimentos (Pawliszyn, 1997; Liu, *et al.*, 2001) y muestras biológicas (Schimming *et al.*, 1999; Ulrich, 2000), dónde la interferencia de la matriz es importante. En términos generales, se puede decir que el volumen del espacio de cabeza tiene que ser lo más pequeño posible, ya que el rendimiento de la extracción disminuye cuando aumenta el volumen del espacio de cabeza por efecto de la dilución (Yang y Peppard, 1994; Pillonel *et al.*, 2002).

Para el análisis simultáneo de gases y analitos poco volátiles, se puede combinar la técnica SPME con el espacio de cabeza dinámico. La fase se encuentra en la pared interior de la aguja con la ventaja que se eliminan los posibles daños en el recubrimiento. A la vez se introduce un volumen de gas en la jeringa. Este sistema se llama SPDE (Solid Phase Dynamic Extraction) y es comercializado por Chromtech (Idstein, Alemania) (Pillonel *et al.*, 2002).

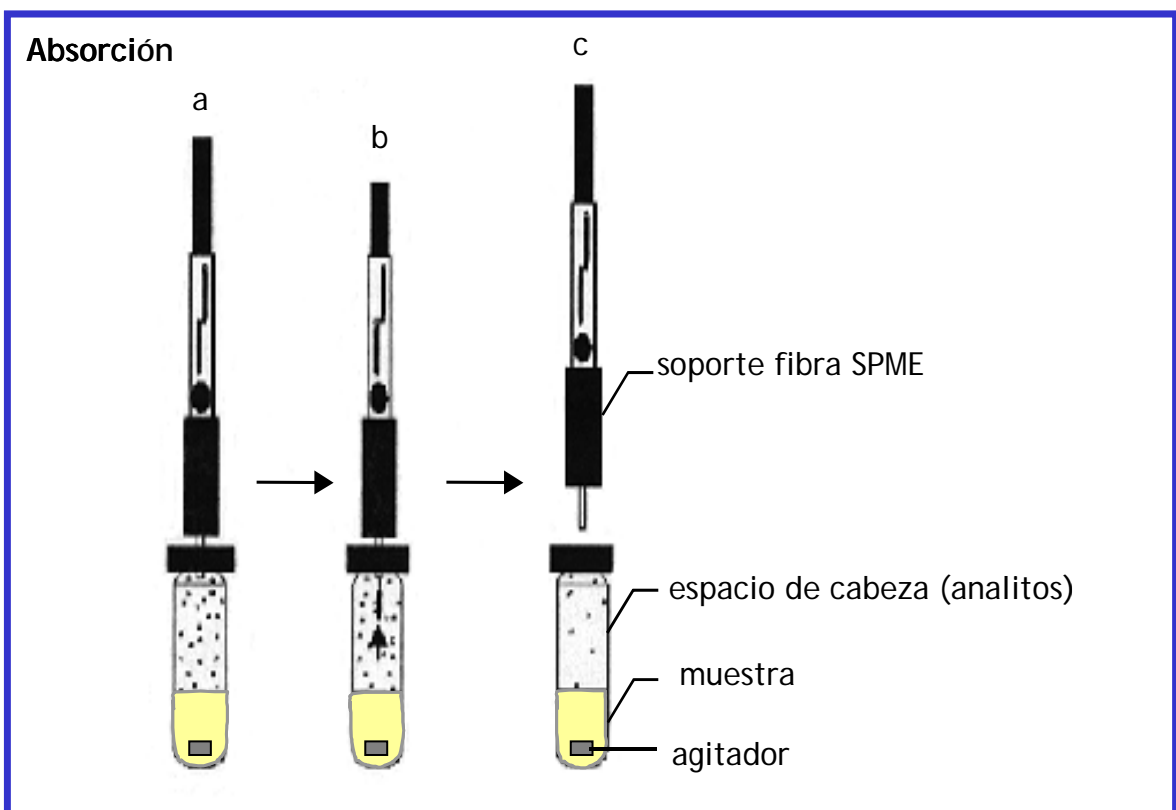


Figura 2.6: Etapa de absorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.

III- Extracción con **protección de membrana** (Pawliszyn, 1997; Lord y Pawliszyn, 2000). Se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra protegiéndola de los compuestos de elevado peso molecular. Este método será útil cuando se emplea el espacio de cabeza para extraer compuestos con baja volatilidad. Si la membrana es de un material apropiado puede facilitar la selectividad del proceso de extracción. La cinética es más lenta que en la inmersión directa, ya que los analitos deben difundir a través de la membrana antes de llegar a la fibra. Para disminuir el tiempo de extracción se pueden usar membranas delgadas e incrementar la temperatura del proceso extractivo.

#### **b) Etapa de desorción**

En esta etapa se liberan los analitos retenidos por la fibra. La desorción se puede realizar de dos formas:

I- Por **desorción térmica**. Se lleva a cabo cuando el SPME se acopla a un cromatógrafo de gases (Figura 2.7). La fibra se inserta en el inyector del cromatógrafo de gases (d) que se encuentra a temperatura suficientemente elevada para que, al bajar de nuevo el émbolo de la jeringa (e), de forma instantánea se desorban los analitos entrando en la columna cromatográfica. Es la forma de desorción más ampliamente utilizada (Constant *et al.*, 1997; Grote *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1997; Aguilar *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1999; Schimming *et al.*, 1999; Simplicio *et al.*, 1999; Chien *et al.*, 2000; Koziel *et al.*, 2000; Cam *et al.*, 2001; Ebeler *et al.*, 2001; Gerecke *et al.*, 2001; Koziel *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2001).

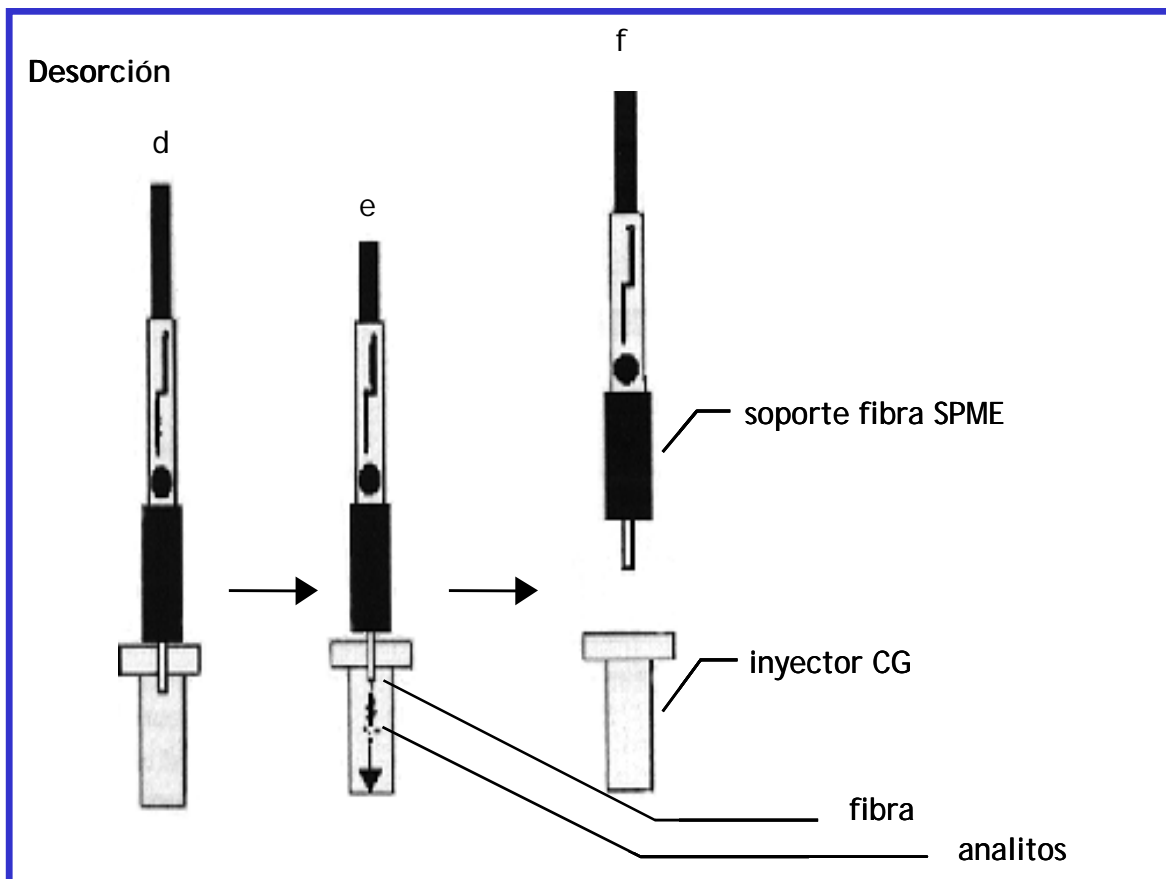


Figura 2.7: Etapa de desorción térmica de los analitos en la fibra de SPME.

II- Por adición de un solvente orgánico. Es un sistema útil para aquellos compuestos que son térmicamente inestables o poco volátiles y, por tanto, no se pueden desorber directamente a las altas temperaturas del inyector del cromatógrafo. En los casos en que se combine la técnica SPME con HPLC, es necesario este tipo de desorción. Habitualmente, se usa una interfase que permite realizar la desorción con la propia fase móvil o bien introduciendo un solvente orgánico adecuado en la cámara de la interfase (Aranda *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; González-Toledo *et al.*, 2002). A la vez, se puede realizar en línea (*on line*) o fuera de línea (*off line*) con el sistema cromatográfico (Negrao, *et al.*, 1998; Pawliszyn, 1999). La desorción de los analitos con disolvente orgánico se ha utilizado para determinar tensioactivos alquilfenoletoxilados (Chen y Pawliszyn, 1995),

hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Negrao y Alpendurada, 1998), fenoles (Carrión, *et al.*, 2002; Peñalver *et al.*, 2002) y ftalatos como el dietilhexilftalato (Nelly, *et al.*, 1999).

En referencia a los tipos de inyección más utilizados en SPME-GC, en la siguiente tabla se expone la compatibilidad del dispositivo de SPME con los diferentes modelos de inyectores (Peñalver, 2002) (Tabla 2.4):

Tipo de inyector	Compatibilidad con SPME	Insertos ( <i>liners</i> )	Válvula de división de flujo ( <i>Split valve</i> )	Diámetro inserto ( <i>liner</i> )
Split/Splitless	SI	Pequeño volumen	Cerrada durante desorción	Similar al diámetro de la fibra
On-column	SI con sistema de calentamiento independiente	Mínimo volumen		
PTV ( <i>Programmable Temperature Vaporizing</i> )	SI	Pequeño volumen	Cerrada durante desorción	Similar al diámetro de la fibra

Tabla 2.4: Compatibilidad del dispositivo SPME con los inyectores.

Los puertos de inyección *Split* o *Splitless* de los cromatógrafos de gases son muy adecuados para realizar la desorción de los analitos de la fibra (Pawliszyn, 1997). La válvula de división (*Split valve*) debe permanecer cerrada durante la desorción, para que la totalidad de los analitos sean introducidos en la columna cromatográfica. El diámetro de la inserción (*liner*) de los inyectores debe ser lo más similar posible al diámetro de la fibra, para asegurar una transferencia rápida de los analitos desde el inyector a la columna.

### 2.3.1.2 Fundamentos teóricos de la SPME

La SPME se basa fundamentalmente en la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra (Pawliszyn, 1997). Así el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra. La extracción de SPME se considera completa cuando la concentración del analito alcanza el equilibrio de distribución entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra (Lord, *et al.*, 2000). Lo que, en la práctica, significa que, una vez llegado al equilibrio, la cantidad extraída es constante y, por tanto, será independiente de un incremento del tiempo de extracción. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra fue desarrollado por Louch *et al.*, (1992). En este modelo se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio ( $n$ ) y la concentración de éste en la muestra ( $C_0$ ). Esta afirmación se muestra en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

$n$ = moles de analito absorbido por la fibra

$V_f$ = volumen de fibra

$V_s$ = volumen de muestra

$K_{fs}$ = coeficiente de partición (constante de distribución) del analito entre fibra/muestra:  $K_{fs}=C_f/C_s$

$C_0$ = concentración inicial de analito en la muestra

Se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del espacio de cabeza.

El modelo matemático de SPME para la extracción de los analitos del espacio de cabeza fue desarrollado posteriormente. Las ecuaciones y conclusiones a las que se llega son similares a las de la extracción por inmersión, pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa (Zhang y Pawliszyn, 1993; Pawliszyn, 1997). La cantidad de analito extraída en el equilibrio, utilizando extracción por headspace o inmersión directa, es la misma, siempre que el volumen de muestra y del espacio de cabeza se mantengan constantes. Esto es debido a que la concentración en el equilibrio es independiente de dónde se encuentre la fibra, ya sea en el espacio de cabeza o en la muestra. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se expone al espacio de cabeza se ajusta a la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s}$$

$n$ = moles de analito absorbido por la fibra

$V_f$ = volumen de fibra

$V_s$ = volumen de muestra

$V_h$ = volumen de espacio de cabeza

$K_{fs}$ = coeficiente de partición del analito entre fibra/muestra:  $K_{fs}=C_f/C_s$

$K_{hs}$ = coeficiente de partición del analito entre muestra/espacio de cabeza:  $K_{hs}= C_h/C_s$

$C_o$ = concentración inicial de analito en la muestra

### 2.3.1.3 Variables que afectan el proceso de SPME

El proceso de SPME se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que influyen sobre el equilibrio de analito extraído o bien sobre su desorción. Estas variables pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción, pero cualquier modificación de las variables o condiciones

experimentales repercute en la cantidad de analito que se determina y, por supuesto, en la repetitividad del análisis.

### 2.3.1.3a Etapa de extracción

Los parámetros que pueden afectar el proceso de absorción/adsorción son los siguientes:

*Tiempo de extracción:* Al desarrollar un método analítico basado en la técnica SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio e intentar trabajar en estas condiciones. Se define el *estado de equilibrio* como aquél a partir del cual la cantidad de analito que se extrae se mantiene constante (Pawliszyn, 1997) y es característico de cada pareja analito-fibra.

Cuando se analiza la fracción volátil y semivolátil de un alimento, el tipo de compuestos que se extraen con la técnica SPME es muy distinto y se precisan tiempos muy variables para alcanzar el equilibrio. Para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar al punto de equilibrio es muy elevado, mientras que para otros es corto. Generalmente, en estos casos se fija un tiempo de extracción de compromiso. Se suele optar por seleccionar tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis, con lo cual para algunos analitos se trabajará en condiciones de no equilibrio. En estos casos, es muy importante controlar estrictamente el tiempo de extracción en aras a la repetitividad de los análisis, ya que como se puede ver en la Figura 2.8 pequeñas oscilaciones pueden variar considerablemente la cantidad de analito extraída.

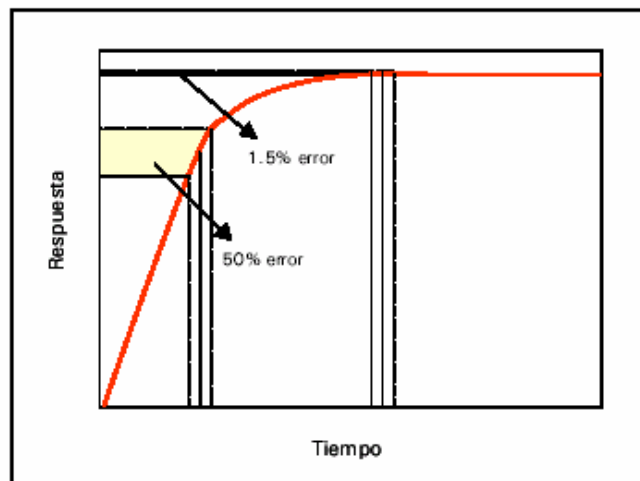


Figura 2.8. Efecto del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída (Pawliszyn, 1997).

Según Pillonel *et al.* (2002) en determinados casos pueden ser recomendables tiempos de extracción cortos, por ejemplo, cuando un compuesto presente un elevado coeficiente de partición y se encuentre a elevada concentración, ya que un largo tiempo puede inducir fenómenos de competencia y dar lugar a resultados sesgados.

**Temperatura de extracción:** Este parámetro contribuye de dos formas opuestas en el proceso de SPME (Pawliszyn, 1997):

I- En el modo de inmersión los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída.

II- En el modo de espacio de cabeza, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza, por lo que la extracción es más rápida, ya que se necesita menos tiempo para alcanzar el equilibrio. Pero, por otra parte, reduce la eficacia de la extracción, ya que un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de partición del analito entre el espacio de cabeza y la fibra y, por tanto, disminuye la cantidad de analito extraída por la fibra en el equilibrio. Para solucionar este problema Zhang y Pawliszyn (1995) diseñaron un



dispositivo de SPME que permite calentar la muestra y simultáneamente enfriar la fibra. Este método se denominó "*Internally cooled SPME*". Este diseño, sin embargo, presenta ciertos problemas de selectividad, ya que al favorecer las condiciones de extracción se facilita también, la extracción de interferencias presentes en la muestra (Zhang y Pawliszyn, 1995).

***Presencia de sales en la muestra:*** Generalmente la presencia de electrólitos en un sistema de adsorción, disminuye la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa, este efecto se llama *salting out* y se utiliza para incrementar la sensibilidad de un método analítico. Las sales aumentan el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada, por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Pero si los analitos se encuentran en forma no ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción debido, probablemente, a un aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución (Pawliszyn, 1997). La adición de sal no es siempre conveniente para moléculas de elevado peso molecular, ya que provoca que los analitos se adhieran al vidrio del contenedor de la muestra o vial. Para la extracción de analitos volátiles y semivolátiles por HS/SPME se usa habitualmente NaCl y, a veces, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

***pH de la muestra:*** Este factor está relacionado con el apartado anterior, ya que los analitos deberán estar mayoritariamente presentes en su forma neutra para favorecer su extracción.

***Volumen de la muestra:*** El volumen debe seleccionarse en función de los coeficientes de distribución de los analitos,  $K_{fs}$ . Si se recuerda la ecuación del anterior apartado 2.3.1.2, se puede deducir que al aumentar el volumen de la muestra aumenta también la cantidad de analito extraída:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

$n$  = moles de analito absorbido por la fibra

$V_f$  = volumen de fibra

$V_s$  = volumen de muestra

$K_{fs}$  = coeficiente de partición (constante de distribución) del analito entre fibra/muestra:  $K_{fs} = C_f / C_s$

$C_o$  = concentración inicial de analito en la muestra

En las condiciones de trabajo de SPME normalmente se cumple que  $V_s \gg K_{fs} V_f$ , o sea, el volumen de muestra ( $V_s$ ) es mucho mayor que el coeficiente de partición (constante de distribución) del analito entre la fibra y la muestra ( $K_{fs}$ ) por el volumen de la fibra ( $V_f$ ). Esto se debe a que el volumen de la fibra es, generalmente, mucho más pequeño que el volumen de muestra, por lo que la ecuación anterior se puede transformar en la siguiente:

$$n = K_{fs} V_f C_o$$

En esta ecuación se puede observar que la cantidad de analito extraída ( $n$ ) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de la muestra. Lo cual significa que, previo al análisis, no es necesario estudiar el volumen de muestra más adecuado a elegir, ya que la fibra puede ser directamente expuesta al aire, agua, ... Esta aproximación no es válida cuando:

- ✓ Los analitos tienen valores de  $K_{fs}$  muy elevados (gran afinidad por la fibra)

- ✓ Se utilicen volúmenes de muestra muy pequeños.

**Solventes orgánicos:** En muestras acuosas disminuye la cantidad de analito extraída, ya que aumenta la solubilidad de los analitos en la fase acuosa. En algunos casos puede favorecer el proceso de extracción debido a cambios en las interacciones entre la fibra y los analitos (Krogh, *et al.*, 1997). También se puede ayudar a la difusión de los analitos desde la matriz hasta la fibra cuando se analizan muestras sólidas, debido a la presencia de agua o de un solvente orgánico (Zhang y Pawliszyn, 1995; Llompart, *et al.*, 1999; Doong y Liao, 2001).

**Agitación de la muestra:** En SPME hay que tener en cuenta la cinética del proceso. Los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o, si la extracción se realiza mediante HS/SPME, desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y, de allí, a la fibra. La efectividad de la agitación determinará el tiempo de equilibrio en muestras acuosas. Por lo general, se considera que el tiempo de equilibrio en compuestos de elevado peso molecular o poco volátiles se reduce mediante agitación, mientras que el efecto será mínimo en compuestos muy volátiles (Pillonel *et al.*, 2002).

Según estos mismos autores, para aumentar la velocidad de la extracción o reducir el tiempo es necesario utilizar un sistema de agitación para:

- ✓ Facilitar la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra.
- ✓ Disminuir el efecto de reducción de la velocidad de extracción causada por la zona estática que se forma alrededor de la fibra.
- ✓ Compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas.

La agitación se puede llevar a cabo mediante:

- Barras magnéticas agitadoras: es la más frecuente y se puede usar en cualquier tipo de SPME.
- Movimiento del vial (vortex) o de la fibra.

- Flujo a través
- Ultrasonidos (Motlagh y Pawliszyn, 1993; Gorecki y Pawliszyn, 1996): es la más efectiva, dando lugar a tiempos de extracción muy cortos, pero presenta el inconveniente que la elevada cantidad de energía suministrada produce un calentamiento que puede provocar la degradación de los analitos (Pawliszyn, 1997).

Si la muestra es gaseosa la agitación no será necesaria, ya que la propia convección del aire será suficiente para llegar rápidamente al equilibrio.

*Tipo de fase:* La eficacia de la extracción depende de la constante de distribución ( $K_{fs}$ ) que es característica de cada pareja analito-fibra y determina:

- ✓ las propiedades del recubrimiento de la fibra
- ✓ la afinidad del analito respecto a otros componentes de la matriz

En el modelo matemático previamente descrito, se considera que la extracción de los analitos se realiza mediante un proceso de absorción. Actualmente existen fibras en las que la extracción se produce mediante un proceso de adsorción o una combinación de ambos (Figura 2.9). En estos casos, el modelo matemático a seguir es ligeramente diferente (Gorecki *et al.*, 1999; Pawliszyn, 1999) y la ecuación que lo define es la siguiente:

$$n = \frac{K_{fs}^D V_f C_o V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f \max} - C_f)}$$

$K_{fs}^D$ = coeficiente de distribución del analito entre muestra y superficie de la fibra

$C_f$ = concentración final del analito en la superficie de la fibra

$C_{f \max}$ = concentración máxima del analito en la superficie de la fibra

En general, los procesos de extracción empiezan con la adsorción de los analitos en la interfase fibra/matriz. Posteriormente, los analitos difunden dentro del volumen de la fase extractiva. Si el coeficiente de difusión de los analitos en la fase extractiva es elevado, la partición de los analitos es completa entre las dos fases y se llega a la absorción. Sin embargo, si el coeficiente de difusión es bajo, el analito se mantiene en la interfase y tiene lugar la adsorción. La principal ventaja de la absorción, también llamada partición, es una isoterma lineal en un amplio rango de concentraciones y las propiedades de la fibra no cambian sustancialmente hasta que la cantidad extraída no llega al 1% del peso de la fase extractiva. Por otro lado, en el proceso de adsorción cuando el recubrimiento de la fibra es grueso, la isoterma no es lineal a concentraciones elevadas. Eso causa un problema para alcanzar el equilibrio y, en consecuencia, en la respuesta de la fibra frente al analito, ya que la extracción varía en función de la concentración de los analitos y las interferencias.

Además de las fibras que están a disposición comercial, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como los de carbón (Mangani y Cenciarini, 1995; Aranda, *et al.*, 2000), C<sub>8</sub> (Popp y Paschke, 1999), C<sub>18</sub> (Xia y Leidy, 2001), polipirrol (Wu *et al.*, 2000), o incluso fibras recubiertas con polímeros de huella molecular (MIPs) (Koster *et al.*, 2001) de manera que se consiguen fibras muy selectivas para el análisis de determinados compuestos. También se han desarrollado recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o inorgánicos (Gbatu *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000). En conclusión, en función de la naturaleza del analito se selecciona la fibra más apropiada a utilizar en cada caso.

Las fibras comerciales se pueden clasificar según si el proceso de extracción se produce mayoritariamente por absorción o adsorción (Figura 2.9). Sus características más destacables se encuentran recogidas en la Tabla 2.5.

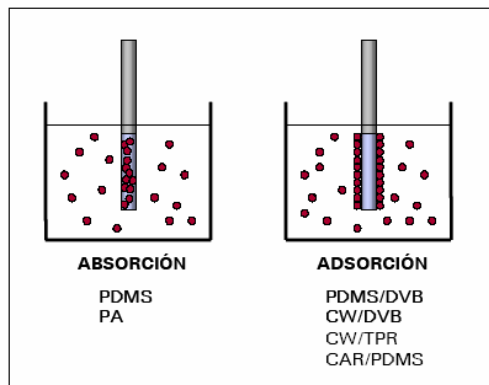


Figura 2.9: Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción.

Fase estacionaria	Espesor	T <sup>a</sup> máxima de uso	Proceso de extracción	Polaridad	Uso recomendado
PDMS (polidimetilsiloxano)	100µm fase no enlazada	280 °C	Absorción	No polar	GC/HPLC
	30µm fase no enlazada	280 °C	Absorción	No polar	GC/HPLC
	7µm fase enlazada	340 °C	Absorción	No polar	GC/HPLC
PDMS/DVB (PDMS/divinilbenceno)	65µm fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC
	60µm fase parcialmente entrecruzada	-	Adsorción	Bipolar	HPLC
	65µm fase muy entrecruzada <sup>1</sup>	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC
PA (poliacrilato)	85µm fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Absorción	Polar	GC/HPLC
CAR/PDMS (carboxen/PDMS)	75µm fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Adsorción	Bipolar	GC
	85µm fase muy entrecruzada <sup>1</sup>	320 °C	Adsorción	Bipolar	GC
CW/DVB (carbowax/DVB)	65µm fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Adsorción	Polar	GC
	70µm fase muy entrecruzada <sup>1</sup>	265 °C	Adsorción	Polar	GC
CW/TPR (CW/templated resin)	50µm fase parcialmente entrecruzada	-	Adsorción	Polar	HPLC
DVB/CAR/PDMS	50/30µm fase muy entrecruzada <sup>1</sup>	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC
	50/30µm fase muy entrecruzada <sup>1,2</sup>	270 °C	Adsorción	Bipolar	GC

Tabla 2.5: Fibras comerciales para SPME.<sup>1</sup> Fibras Stableflex: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible; <sup>2</sup> longitud especial de 2cm

**PDMS (polidimetilsiloxano):** Las fibras de PDMS, consisten en un polímero líquido que resiste temperaturas superiores a 300°C en el inyector. Es una fase no polar que favorece la extracción de compuestos no polares, pero que si se optimizan las condiciones de extracción (pH, sal y temperatura) también se puede usar para compuestos polares. La afinidad de los analitos por el polímero PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en columnas capilares cromatográficas de PDMS (Pawliszyn, 1997). Las fibras comerciales de PDMS son de diferente espesor y, como regla general, se usa la más delgada con la que se obtiene el límite de detección requerido. En general, se recomienda utilizar la de 100  $\mu\text{m}$  para compuestos con coeficiente de partición bajos y de poco espesor para los compuestos con coeficientes de partición elevados. La reducción de la fibra de 100  $\mu\text{m}$  a 7  $\mu\text{m}$  limita su aplicación a un número más reducido de analitos, pero permite trabajar a mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas. La extracción de los analitos con la fibra PDMS se debe, principalmente, a un fenómeno de absorción, aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunas sustancias (sobretudo si son muy apolares) puede realizarse vía adsorción, ya que existe cierta competitividad entre los dos efectos (Yang, *et al.*, 1998; Baltussen, *et al.*, 1999; Poerschman, *et al.*, 2000; Vaes, *et al.*, 2000).

**PA (poliacrilato):** son fibras adecuadas para analitos polares y aunque su recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos igual que en las fibras PDMS (Arthur y Pawliszyn, 1990; Gorecki y Pawliszyn, 1999; Pawliszyn, 1999). Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que ofrecen en las fibras de PDMS. Por esta razón, lo más probable es que los tiempos de extracción de los compuestos volátiles sean mayores utilizando la fibra de PA (Arthur y Pawliszyn, 1990).

**Fibras en las que se combina más de un polímero:** son las más adecuadas para la determinación de un amplio abanico de analitos volátiles. Esto es debido a que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos es por adsorción, ya que se trata de polímeros sólidos (Pawliszyn, 1997). En general, en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan para las fibras PDMS, pero presentan algún inconveniente:

- el intervalo lineal de concentración es menor que en las fibras de absorción
- se presentan fenómenos de competencia (Pawliszyn, 1997)

La fibra **Carbowax-Divinilbenceno (Cw/DVB)** es la más polar entre las que tienen más de un polímero y está parcialmente indicada para la determinación de alcoholes y compuestos polares (Pillonel *et al.*, 2002).

El **Carboxen (CAR)** es carbon molecular que contiene macro, meso y microporos y se utiliza combinada con PDMS. Las moléculas grandes no pueden entrar en los microporos, lo que facilita que las combinaciones CAR/PDMS incrementen la extracción de pequeñas moléculas (Pillonel *et al.*, 2002).

La **Divinilbenceno (DVB)** se combina también con PDMS. El DVB es un polímero sólido con poros más grandes que la CAR, lo que permite extraer moléculas más grandes que la anterior (Pillonel *et al.*, 2002).

La combinación de **CAR, DVB y PDMS** proporciona una mayor capacidad. En esta fibra, una primera capa de PDMS/CAR se cubre con una segunda capa de PDMS/DVB. Las moléculas pequeñas con mayores coeficientes de difusión llegan a la capa interior más rápido y son adsorbidas por la fibra de Carboxen. Las moléculas más pesadas son retenidas en la capa exterior de DVB. Esta configuración facilita también la desorción (Pillonel *et al.*, 2002).



En la Figura 2.10 se observan los principales criterios que se pueden utilizar a la hora de seleccionar la fibra más adecuada en función de las propiedades de volatilidad y polaridad de los analitos.

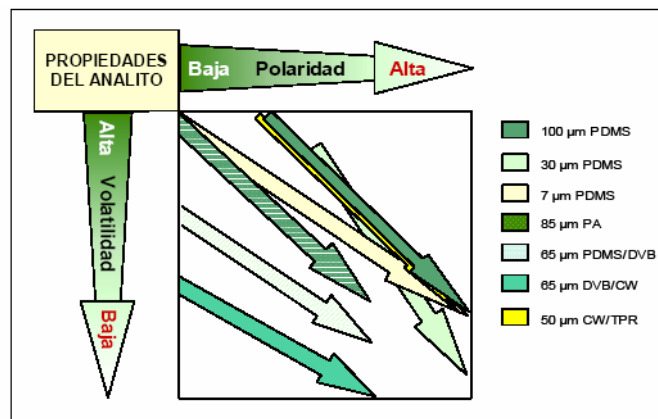


Figura 2.10: Guía de selección de las fibras de SPME en función de las propiedades del analito.

El efecto de la polaridad de las fibras se ha demostrado en diversos estudios que comparan fibras para la extracción de compuestos polares (Bartak y Cap, 1997; Hall y Brodbelt, 1997; Ferrari *et al.*, 1998). No obstante, la polaridad de la fibra muestra un efecto mínimo en la extracción de moléculas de bajo peso molecular (Shirey, 2000). Parece que, en la extracción de moléculas pequeñas, la porosidad y el espesor de la fibra influyen más que la polaridad (Pillonel *et al.*, 2002).

### 2.3.1.3b Etapa de desorción

La desorción térmica de los analitos en el inyector de un cromatógrafo de gases depende de la volatilidad de los analitos, de la posición de la fibra en el inyector, del espesor de la fibra, de la temperatura del inyector y del tiempo de exposición. A medida que aumenta la temperatura, los coeficientes de partición fibra/gas portador, disminuyen y, asimismo, disminuye rápidamente la capacidad de la fibra para retener los analitos. El flujo constante de gas portador en el inyector del cromatógrafo de gases facilita la liberación de los analitos. Por tanto, los

parámetros a optimizar cuando la desorción se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases son:

**Temperatura de desorción:** como regla general se recomienda fijar como temperatura aquella que es la máxima recomendada por el fabricante de la fibra. Al aumentar la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos y arrastrados por la columna por el flujo del gas portador. En la siguiente ecuación se observa como disminuyen linealmente los coeficientes de partición al aumentar la temperatura.

$$\log K_{fs} = a\left(\frac{1}{T}\right) + b$$

$K_{fs}$ = coeficiente de partición entre fibra y muestra líquida

a y b= constantes

T= temperatura

Frecuentemente, la temperatura óptima de desorción es aquella que coincide aproximadamente con la del punto de ebullición del analito menos volátil.

**Tiempo de desorción:** debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos sea completa y no queden restos en la fibra. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos.

**Diámetro del inserto (liner):** debe ser lo más similar posible al diámetro de la fibra para asegurar una transferencia rápida desde el inyector a la columna. Para ello se suelen emplear insertos de volumen reducidos como los que se muestran en la Figura 2.11.

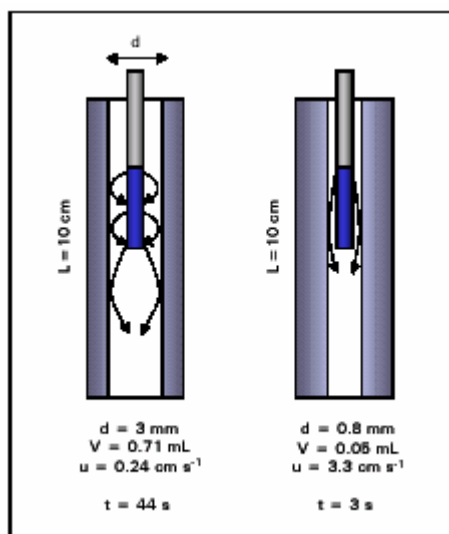


Figura 2.11: Efecto del volumen del liner en la desorción térmica (Peñalver, 2002)

*Posición de la fibra en el inyector:* debe quedar situada en el centro del inserto durante la desorción, para que se produzca un calentamiento rápido y reproducible (Pawliszyn, 1997).

### 2.3.2 Aplicaciones de SPME en alimentos

Como ya se ha mencionado, la microextracción en fase sólida se desarrolló inicialmente para el análisis de contaminantes en aguas residuales (Zhang y Pawliszyn, 1993; Sandra *et al.*, 1996; Schumacher, 1997). Progresivamente fueron aumentando las aplicaciones, de manera que en la actualidad se utiliza para todo tipo de compuestos volátiles o contaminantes en alimentos: pesticidas, herbicidas y otras sustancias residuales en frutas y derivados (Boyd-Boland y Pawliszyn, 1995; Urruty y Montury, 1996; Gandini y Riguzzi, 1997; Vitali, *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999; Simplicio y Boas, 1999; Wang, *et al.*, 2000; Blasco, *et al.*, 2003; Berrada *et al.*, 2004; Betivenga, *et al.*, 2004; Hernández-Borges, *et al.*, 2004; Insa, *et al.*, 2004; Martínez-

Urunuela, *et al.*, 2004; Schulbach, *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004; Zambonin, *et al.*, 2004; Zierler, *et al.*, 2004; Hernández-Borges, *et al.*, 2005).

En la Tabla 2.6 se ha dispuesto una recopilación bibliográfica de los principales trabajos realizados mediante SPME en frutas, zumos y vinos, detallando el objetivo de cada trabajo, las muestras, los analitos determinados, el tipo de fibra y si se ha realizado o no una cuantificación.

Referencia	Objetivo del estudio	Muestras	Analitos	Fibra	Cuantificación
<b>Fruta</b>					
Matich <i>et al.</i> , 1996	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparación SPE y SPME</li> <li>Aplicación a muestras</li> </ul>	Manzana	Perfil volátil	PDMS 100µm	Áreas relativas respecto al compuesto mayoritario ( $\alpha$ -farnesenol)
Verhoeven <i>et al.</i> , 1997	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desarrollo de un método</li> <li>Aplicación a muestras</li> </ul>	Manzana, fresa	Artefactos de reacción de Maillard	PA 85µm	No
Song <i>et al.</i> , 1997	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optimizar método</li> <li>Aplicación a muestras</li> </ul>	Manzana	Perfil volátil	PDMS 100µm	No
Paliyath <i>et al.</i> , 1997	Efecto del escaldado de la fruta sobre los compuestos volátiles	Manzana	Perfil volátil	PDMS 100µm	No (cuentas de área)
Ibáñez <i>et al.</i> , 1998	Aplicación de SPME al análisis de volátiles	Fresa, mango, plátano, frambuesa, zarzamora	Perfil volátil	PDMS 100µm	No
Song <i>et al.</i> , 1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>Calcular coeficientes partición con diferentes fibras</li> <li>Análisis cualitativo de las muestras</li> </ul>	Fresa, tomate	Perfil volátil y patrones	PDMS 100µm PDMS/DVB 65µm CAR/DVB 65µm	Normalización
Wan <i>et al.</i> , 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>Perfil volátil</li> <li>Estudiar cambios durante el almacenamiento</li> </ul>	Kiwi	Perfil volátil	CAR/DVB 65µm	Semicuantitativa (PI 2-octanona)
Augusto <i>et al.</i> , 2000	Determinación de principales aromas en fruta de Brasil	Cupuassu, cajá, siriguela, graviola	Perfil volátil	PDMS 100µm PA 85µm CW/DVB 65µm CAR/PDMS 75µm	No
Servili <i>et al.</i> , 2000	Optimización del escaldado utilizando compuestos volátiles como marcadores	Tomate	Perfil volátil	CAR/DVB 65µm	No (cuentas de área)

Lamikanra y Richard, 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>Identificar cambios durante el almacenamiento</li> </ul>	Melón	Perfil volátil	PDMS 100µm	Semicuantitativa (PI benzotiofeno)
Rudell <i>et al.</i> , 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudiar el metabolismo en diferentes tejidos</li> <li>Efecto de la anoxia en la biosíntesis de volátiles</li> </ul>	Manzana	Derivados de 1-pentanol y otros alcoholes	PDMS 100µm	Sí con patrones
Ruiz del Castillo <i>et al.</i> , 2002	Perfil terpénico en diferentes variedades	Grosella negra	Perfil terpénico y terpenos quirales	PDMS/DVB 65µm	Normalización interna
Ayala-Zavala <i>et al.</i> , 2004	Efecto de las diferentes temperaturas de almacenamiento	Fresa	Perfil volátil	PDMS/DVB 65µm	No (cuentas de área)
Reid <i>et al.</i> , 2004	Estudiar adulteraciones del puré de fresa con puré de manzana	Puré de fresa	Perfil volátil	PDMS 100µm	Normalización
<b>Zumos de fruta</b>					
Yang y Peppard, 1994	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudio del método con patrones</li> <li>Aplicación cualitativa</li> </ul>	Zumo de naranja café aceite vegetal	Perfil volátil	PDMS 100µm	Normalización
Steffen y Pawliszyn, 1996	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparación fibras con patrones</li> <li>Validación y aplicación</li> </ul>	Zumo de naranja	Perfil volátil	PDMS 100µm PA 85µm	Sí con patrones
Jia <i>et al.</i> , 1998	Optimización del método	Zumo de naranja	Perfil volátil	PDMS 100µm	Sí con patrones
Jia <i>et al.</i> , 1999	Estudiar los cambios en los volátiles según conservación	Zumo de naranja	Perfil volátil	PDMS 100µm	No
Miller y Stuart, 1999	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparación <i>headspace</i> estático y SPME</li> <li>Aplicación a zumos</li> </ul>	Zumo de naranja, limón y lima	Perfil volátil	PDMS 100µm Carboxen 75µm CW/PDMS 65µm PDMS/DVB 65µm	Sí con patrones

Siegmund <i>et al.</i> , 2001	Cambios durante el almacenamiento	Zumo de fresa	Perfil volátil	CAR/PDMS 75µm	Semicuantitativa (PI camfor)
Ruiz del Castillo <i>et al.</i> , 2003	Identificación de terpenos quirales	Zumo de naranja	Terpenos quirales	PDMS 100µm	Sí
Zierler <i>et al.</i> , 2004	<ul style="list-style-type: none"> <li>Validación de un método</li> <li>Aplicación a muestras</li> </ul>	Zumo de manzana	<i>Off-flavor</i>	CAR/PDMS 75µm DVB/CAR/PDMS 50/30µm	Sí
Pérez <i>et al.</i> , 2005	Aplicación a zumos de diferentes temperaturas de almacenamiento	Zumo de mandarina	Perfil volátil	DVB/CAR/PDMS 50/30µm	Sí
<b>Vinos y Cavas</b>					
de la Calle-García <i>et al.</i> , 1996	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optimización del método</li> <li>Estudio con patrones</li> <li>Aplicación</li> </ul>	Vino blanco (Müller-Thurgau)	Terpenos	PA 85µm	No
de la Calle-García <i>et al.</i> , 1997	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparación de fibras</li> <li>Aplicación</li> </ul>	Vino blanco (Muscats, Riesling, Elbling, Silvaner)	Perfil volátil	PA 85µm	Semicuantitativa (PI 3-decanol)
Fischer y Fischer, 1997	Desarrollar método	Vino Riesling	2,4,6-tricloroanisol	PDMS 100µm	Sí
de la Calle-García <i>et al.</i> , 1998	Optimización del método	Vino blanco (Müller-Thurgau, Riesling, Silvaner)	Terpenoides	PA 85µm	Semicuantitativa (PI 3-octanol y 3-decanol)
de la Calle-García <i>et al.</i> , 1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>Comparación SPME directo con HS/SPME</li> <li>Caracterización (añada, variedades)</li> </ul>	Vino blanco de 7 variedades alemanas	Perfil volátil	PA 85µm	Semicuantitativa (PI 3-decanol)
Mestres <i>et al.</i> , 1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optimización del método</li> <li>Aplicación a muestras</li> </ul>	Vinos blancos y tintos	Compuestos azufrados	PDMS 100µm PA 85µm	Semicuantitativa (PI tiofeno y MeSEt)

Vas <i>et al.</i> , 1998	Demostrar capacidad de SPME para aroma del vino	Vino blanco (Muscat, Chardonnay, Traminer)	Perfil volátil	PDMS 100µm PA 85µm	Semicuantitativa (PI octanoato de etilo)
Vas <i>et al.</i> , 1998	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparación fibras</li> <li>• Aplicación a vinos</li> </ul>	Vino tinto (Bläufrankish)	Perfil volátil	PDMS 100µm PA 85µm	Semicuantitativa (PI octanoato de etilo)
Mestres <i>et al.</i> , 1999a	Desarrollar método	Vino y solución modelo	Compuestos azufrados	CAR/PDMS 75µm	Sí
Mestres <i>et al.</i> , 1999b	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimización y validación de método</li> <li>• Aplicación a vinos</li> </ul>	Vino blanco, rosado y tinto	Compuestos azufrados	CAR/PDMS 75µm	Semicuantitativa (PI tiofeno y etilmetilsulfito)
Francioli <i>et al.</i> , 1999	Determinación de volátiles de cavas con distinta crianza	Cavas monovarietales	Perfil volátil	PDMS 100µm	Semicuantitativa (PI nonanoato de etilo)
Hayasaka y Bartowsky, 1999	Desarrollar un método HS/SPME	Vino blanco Chardonnay y tinto Cabernet Sauvignon y Shiraz (Australia)	Diacetil (2,3-butanodiona)	PDMS 100µm CW/DVB 65µm	Semicuantitativa (PI diacetilo deuterado)
Weber <i>et al.</i> , 1999	Clasificación de vinos según su composición en terpenos	Vinos alemanes (Blankenhornsberg, Alzey, Durbach, Freiburg-Unstrut, Geisenheim, Oppenheim)	Terpenos	PA 85µm	Semicuantitativa (PI 3-decanol)
Bellavia <i>et al.</i> , 2000	Desarrollo de método	12 vinos (5 tintos, 6 blancos y 1 rosado)	Benzotiazol	CW/DVB 65µm	Sí
Murányi y Kovács, 2000	Estudio del aroma	Vinos de la zona Tokay (Hungria)	13 compuestos	PDMS 100µm	No
Sala <i>et al.</i> , 2000	Desarrollar un método para determinar pirazinas en vino	Uvas Merlot y Cabernet Sauvignon y sus mostos	7 pirazinas	PDMS 100µm PDMS/DVB 65µm CAR/PDMS 75µm CW/DVB 65µm	Sí



Whiton y Zoecklein, 2000	Efecto de la matriz y muestreo de los compuestos volátiles	Vino Pinot noir	esteres, alcoholes, ácidos, fenoles volátiles y norisoprenoide s	CW/DVB 65µm	Normalización
Baptista <i>et al.</i> , 2001	Comparar perfil volátil de diferentes vinos	36 vinos de diferentes regiones (Portugal y Islas Azores)	Perfil volátil	PA 85µm CW/DVB 65µm PDMS/DVB 65µm PDMS 100 y 30µm	Semicuantitativa (PI 2-nonanona)
Guadarrama <i>et al.</i> , 2001	Diferenciar vinos de distintas regiones	3 blancos de D.O. Rueda y 1 de D.O. Bierzo y Muscat de Zamora y 2 tintos de Ribera del Duero	Perfil volátil	PDMS 100µm	No
Marengo <i>et al.</i> , 2001	Determinación del <i>bouquet</i>	Vinos de Piamonte: Barolo, Barbaresco, Nebbiolo d'Alba, Roero, Langhe Nebbiolo	Perfil volátil	PDMS 100µm PA 85µm	Sí
Pozo-Bayón <i>et al.</i> , 2001	Analizar compuestos volátiles de vinos	Blancos: 4 vinos Malvar, 4 Airén y Rosados: 4 Monastrell	Perfil volátil	PDMS 100µm	Sí
Rocha <i>et al.</i> , 2001	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudiar el comportamiento de la fibra en función de la familia química del compuesto</li> <li>Optimización del método</li> <li>Aplicación a vinos</li> </ul>	Vinos blancos: Arinto, Bical, Cerceal, Maria Gomes (Portugal)	9 compuestos	PA 85µm	Sí

Vaz Freire <i>et al.</i> , 2001	Estudiar la variación de los volátiles durante la fermentación	Moscatel	2-metilpropa-nol, 3-metilbutanol, hexanol, linalool, 3-metilbutilo, acetato de etilo y hexilo y hexanoato de etilo	PA 85µm	Sí
Vianna y Ebeler, 2001	Optimizar método para estudiar la formación de ésteres durante la fermentación	Chardonnay	Ésteres de etilo y acetatos	PDMS 100µm PA 85µm	Sí
Escalona <i>et al.</i> , 2002	Efectos de la madera en la composición volátil	Vino tinto variedad Cencibel	Perfil volátil	PA 85µm	Normalización
Mallouchos <i>et al.</i> , 2002	Monitorización de volátiles durante la fermentación	Mosto Moshofileo (Grecia)	Ésteres de acetato y alcoholes superiores	PDMS 100µm PA 85µm	Semicuantitativa (PI heptanoato de metilo)
Mestres <i>et al.</i> , 2002	Aplicar un método HS/SPME	3 blancos, 3 rosados y 3 tintos	Compuestos azufrados	CAR/PDMS, 75µm DVB/CAR/PDMS, 50/30µm	Sí
Monje <i>et al.</i> , 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>Optimizar parámetros SPME para determinar etilfenoles</li> <li>Comparar con extracción líquido-líquido</li> </ul>	Vino tinto	Etilfenoles	PA 85µm	Sí
Rodríguez-Bencomo <i>et al.</i> , 2002	<ul style="list-style-type: none"> <li>Estudio de diferentes fibras</li> <li>Aplicación</li> </ul>	Vinos blancos de las Islas Canarias	Ésteres	PDMS 100µm PDMS 7µm PDMS/DVB 65µm PA 85µm	Sí

Sala <i>et al.</i> , 2002	Desarrollar método para vinos y mostos	Merlot y Cabernet Sauvignon mostos y vinos	6 pirazinas	PDMS/DVB 65µm	Sí
Whiton y Zoecklein, 2002	Determinación del Carbamato de etilo en vino	Vino y solución modelo	Carbamato de etilo	PDMS 100µm PDMS/DVB 65µm CW/DVB, 65µm PA 85µm CAR/DVB, 65µm	Sí
Bonino <i>et al.</i> , 2003	Identificar compuestos volátiles en distintas variedades	Vinos elaborados con Ruché, Malvasia, Brachetto, Cabernet, Pinot noir, Pinot grigio, Merlot, Croatina, Nebbiolo	Perfil volátil	PDMS 100µm PDMS/DVB 65µm CW/DVB 65µm	Semicuantitativa (PI 2-octanol)
Francioli <i>et al.</i> , 2003	Obtener marcadores de evolución	221 cavas de 9 meses a 7 años envejecimiento	Perfil volátil y marcadores de edad	PDMS 100µm	Semicuantitativa (PI nonanoato de etilo)
Martí <i>et al.</i> , 2003	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caracterizar el aroma de un vino</li> <li>• Identificar los compuestos más activos por olfatometría</li> </ul>	Vinos Garnacha (Priorat)	Perfil volátil	PDMS 100µm PA 85µm DVB/CAR/PDMS 50/30µm	No
Pozo-Bayón <i>et al.</i> , 2004	Evaluar la calidad de cavas elaborados con uvas de distinto rendimiento de viñedo	Parellada	Perfil volátil	PDMS 100µm	Sí
Torrens <i>et al.</i> , 2004	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimización método</li> <li>• Aplicación a vino</li> </ul>	Vino blanco y vino tinto	Perfil volátil	PDMS, 100µm PDMS/DVB 65µm PDMS/CAR, 75µm PDMS/DVB/CAR, 50/30µm	Semicuantitativa (PI 2-octanol, nonanoato de metilo, ácido 2-metilhexanoico)

Tabla 2.6: Datos bibliográficos sobre aplicaciones de SPME en alimentos.

## 2.4 Caracterización de polisacáridos

Debido al elevado precio de algunas frutas, los productores que elaboran transformados, recurren a preparar mezclas con otras frutas más económicas, pudiendo constituir una adulteración. A veces, también se puede encontrar menos cantidad de fruta de la esperada. Estos dos tipos de adulteraciones son muy difíciles de controlar y pueden suponer también una merma en la calidad del producto final (Fügel *et al.*, 2004). Poder garantizar la autenticidad de los derivados de fruta es importante para la protección del consumidor. En el control de calidad han sido utilizados: aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares y minerales (Nehring *et al.*, 1978; Wallrauch, 1995). Pero estos parámetros están sujetos a considerables variaciones y pueden ser fácilmente manipulables. Para diferenciar variedades de fruta, también se han empleado compuestos fenólicos, pero éstos se alteran fácilmente en función de múltiples factores como el grado de madurez, el cultivo y el origen geográfico. Asimismo, se han utilizado métodos espectroscópicos de RMN o IRMS pero son excesivamente sofisticados y requieren una amplia experiencia técnica.

En este trabajo se ha planteado utilizar el perfil volátil de las frutas como control de calidad en bebidas derivadas de fruta, como zumos y néctares, y derivados de uva, como el vino. La técnica de HS/SPME elegida debe ser útil o discriminante para ser utilizada en el control de calidad de la industria, pero también suficientemente económica, rápida y fácil de aplicar, propiedades que parece reunir. No obstante los compuestos volátiles quedan más o menos retenidos en las bebidas estudiadas en función de las macromoléculas presentes capaces de interaccionar con ellos. En el caso de las frutas, las macromoléculas mayoritarias que actúan de soporte de los volátiles son los polisacáridos, los cuáles también pueden ser útiles como criterio de calidad.

Hasta el momento existen numerosos estudios centrados en la composición de la pared celular vegetal, sobretodo aquellos que se refieren a su organización y

estructura y a los cambios que sufre durante la maduración. Pero existen pocos trabajos que estudien los polisacáridos solubles como parámetros de control de calidad para la autenticación de bebidas derivadas de fruta (Fügel *et al.*, 2004).

#### 2.4.1 Antecedentes bibliográficos

Los polisacáridos se encuentran repartidos por las paredes vegetales, en las pulpas y en la piel. Los polisacáridos que posteriormente se encuentran presentes en las bebidas derivadas de frutas son, principalmente, de tipo hidrosoluble y, mayoritariamente, se tratará de pectinas. Las sustancias pécticas o pectinas representan una tercera parte de la sustancia seca de la pared primaria celular, dónde se combinan con la hemicelulosa ejerciendo de cemento intercelular. Durante la maduración fisiológica del fruto y los tratamientos tecnológicos que se aplican para obtener derivados de fruta, sufren una serie de cambios en su contenido y estructura. La regulación cualitativa de la pectina durante la maduración del fruto, ha sido extensamente estudiada en kiwi (Redgwell *et al.*, 1992), plátano (Wade *et al.*, 1992), mango (Muda *et al.*, 1995), melocotón (Hedge y Maness, 1996), albaricoque (Femenia *et al.*, 1998), melón (Rose *et al.*, 1998) y aceituna (Jimenez *et al.*, 2001).

Las pectinas se definen como heteropolímeros de alto peso molecular que contienen mayoritariamente unidades de ácido galacturónico (mínimo un 65% del peso) u otros ácidos urónicos unidos por enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  esterificados en proporción variable con metanol y parcial o totalmente neutralizados con una base (Leoni y Fortini, 1985; Phillips y Williams, 2000; Kashyap *et al.*, 2001; Savary y Nuñez, 2003) (Figura 2.12). Las pectinas derivan de la rotura de protopectinas más complejas que están presentes en los tejidos de las plantas. Además poseen cierta proporción de azúcares neutros como ramnosa, galactosa, arabinosa, y cantidades menores de otros azúcares. Las unidades de ramnosa intercaladas en la parte reductora de la cadena mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow2)$  y las unidades de ramnosa unidas a la parte no reductora

mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  producen una irregularidad en la estructura de la cadena. La presencia de ramnosa provoca una desviación de  $90^\circ$  llamada **codo péctico** (Thibault, 1979). La cadena lleva ramificaciones laterales más o menos largas, unidas a nivel de las funciones alcohol secundario.

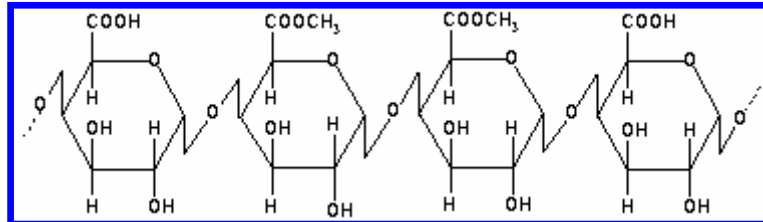


Figura 2.12: Estructura básica de las pectinas.

Ligados a la ramnosa se encuentran cadenas laterales unidas por enlace  $\alpha(1\rightarrow4)$  con arabinosa, galactosa o arabinogalactosa. En las cadenas laterales, las unidades de arabinosa están unidas con enlaces  $\alpha(1\rightarrow5)$  mientras que la galactosa está unida mediante enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  pero también,  $\alpha(1\rightarrow3)$  y  $\alpha(1\rightarrow6)$ . Otros compuestos que también se encuentran en la cadena lateral son ácido glucurónico, fructosa, glucosa, manosa y xilosa (Van Buren, 1991).

Las regiones con pocas unidades de ramnosa se llaman *smooth* o bien homogalacturonanos, mientras que las regiones con muchas unidades de ramnosa se llaman *hairy* o ramnogalacturonanos (Schols *et al.*, 1990). Estas regiones están ampliamente ramificadas con azúcares neutros (arabinosa, galactosa o xilosa) y altamente acetiladas. A su vez, la región ramnogalacturonano se subdivide en ramnogalacturonano de tipo I (RG I; el mayor constituyente de la pared celular) y ramnogalacturonano de tipo II (RG II; mucho más variable, comprende muchos azúcares poco habituales como 2-o-metilxilosa, apiosa, ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico o Kdo, ácido 3-deoxi-D-lixo-heptulosárico o Dha y ácido cérico, característico de esta pectina). Se ha demostrado que RG II se encuentra predominantemente como dímero en las paredes celulares de las plantas en forma de borato-diol diéster unido a un residuo de apiosa (Doco *et al.*, 1997). Además, esta

fracción polisacáridica es la más soluble durante la elaboración de zumos de fruta. Doco *et al.* (1997) han demostrado que esta fracción es resistente a la acción enzimática de los enzimas usados durante la elaboración de los zumos, mientras que otros polisacáridos pécticos como homogalacturonanos o ramnogalacturonanos son altamente degradados. Aunque todavía no se ha evaluado la consecuencia tecnológica que esto supone, estas zonas galacturónicas han estado ampliamente descritas en la literatura para algunas frutas como pera (Yoshioka *et al.*, 1992; Schols y Voragen, 1994), cebolla (Ishii, 1982), arroz (Thomas *et al.*, 1989), kiwi ((Redgwell *et al.*, 1992), rábano (Kobayashi *et al.*, 1996) y vino tinto, ya que debido a su alta solubilidad es uno de los principales componentes de la uva que pasa al vino (Pellerin *et al.*, 1996).

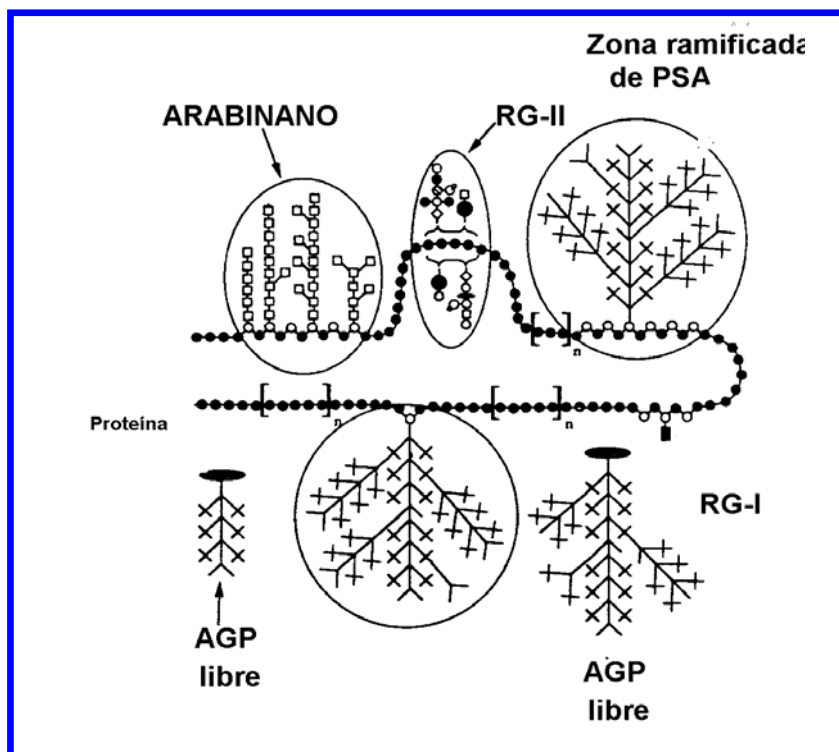


Figura 2.13: Modelo estructural de las sustancias pécticas de la uva (Doco *et al.*, 1995).

Existen diferentes formas de clasificar las pectinas, una de ellas es por el grado de esterificación, es decir, el número de funciones carboxilo esterificadas por

100 grupos galacturónicos (Rolin *et al.*, 1998); esto permite distinguir dos grupos de pectinas:

- pectinas fuertemente metiladas (H.M. > 55 %)
- pectinas débilmente metiladas (L.M. < 45 %)

Sin embargo, la más habitual es por su solubilidad (según el tipo de extracción de la pared celular):

★ Pectina soluble en agua: tiene casi todos los grupos carboxilos esterificados con metanol, *pectina altamente metoxilada (high methoxyl, H.M.)*.

★ Pectina poco soluble en agua: ha sufrido la hidrólisis de los grupos metoxilados, *pectina de bajo metoxilo (low methoxyl, LM.)*. En presencia de iones de calcio, es insoluble en agua, pero se solubiliza en presencia de secuestradores de iones (como EDTA). Cuando la proporción de grupos metilados es pequeña se llaman ácidos pectínicos y cuando es nula ácido péctico (ácido poligalacturónico).

★ Pectina soluble en medio alcalino: una fracción de la pectina está unida a celulosa, la *protopectina* insoluble, pero puede extraerse con bases fuertes.

Comercialmente, la pectina se subdivide según su grado de esterificación metílica en: pectina con alto grado de esterificación (HM o "*high methoxyl*"), cuando el grado de esterificación es superior al 50%, y pectina de bajo grado de esterificación (LM o "*low methoxyl*"), cuando el grado de esterificación es menor del 50%. Existe también un tercer grupo, cuando en la pectina LM se sustituye un grupo metilo por un grupo amido. En este caso se habla de grado de amidación (AD) como el porcentaje de grupos carboxilo transformados a forma amídica (Finzi, 1999).

Las pectinas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria gracias a sus propiedades espesantes y gelificantes. Debido a que la pectina es un hidrocoloide cargado es sensible a variaciones de pH y, en mayor o menor grado, a la naturaleza y cantidad de cationes presentes. En la fabricación de un zumo hay que considerar cuál



es la turbidez adecuada y ésta depende de los sólidos en suspensión. En la manufactura del zumo (Figura 2.1), los extractores industriales incorporan una gran cantidad de pulpa (Will y Dietrich, 1992), cuyo exceso se elimina por centrifugación o filtración, tanto más severa cuanto mayor sea la limpidez del producto final. Las partículas en suspensión están formadas principalmente por celulosa, pectinas y otros compuestos de tipo lipídico. Las pectinas también contribuyen a la viscosidad y cuerpo del zumo, pero mientras que la turbidez depende de la cantidad y estado de no degradación de las pectinas presentes, la viscosidad depende de la concentración y grado de polimerización de las mismas (Primo Yúfera, 1998). El proceso de producción resulta un factor determinante para la cantidad y calidad de los coloides que pasarán al zumo o néctar de fruta (Will y Dietrich, 1992). Según Sharma *et al.*, (1998) el peso molecular, el tipo de polisacárido, el grado de esterificación y las cadenas laterales son fundamentales para la textura de los productos vegetales. A determinadas condiciones de actividad de agua, pH y concentración de cationes, la pectina en solución acuosa a alta temperatura, forma una red tridimensional que una vez enfriada da lugar a un gel. El grado de metoxilación es el primer factor que determina las condiciones y mecanismo por el que gelifican las pectinas comerciales (Savary y Nuñez, 2003).

#### **2.4.2 Relación aromas con polisacáridos**

Los alimentos son productos complejos que contienen compuestos volátiles y no volátiles pertenecientes a una gran variedad de estructuras químicas (Seuvre *et al.*, 2005). La interacción de las moléculas aromáticas con carbohidratos, lípidos y proteínas, afecta a la retención de los aromas en el alimento (Seuvre *et al.*, 2005) y, en consecuencia, a la tasa de volátiles en la fase gaseosa. Estas interacciones repercuten en la intensidad y calidad del aroma de los alimentos, por tanto, influyen en la percepción del aroma (Godshall, 1997; Rabe *et al.*, 2003). Asimismo, estas

interacciones son muy difíciles de comprobar en el propio alimento y, por este motivo, su estudio se ha realizado habitualmente en sistemas modelo que pretenden ser un reflejo de lo que puede ocurrir en el alimento (Voilley *et al.*, 1991). La fijación de aromas por la matriz sólida es vital en la aromatización de los alimentos, en la conducta del aroma y en el procesado y almacenado de los productos (Belitz y Grosch, 1988). En este sentido, es importante estudiar la liberación de los compuestos aromáticos de alimentos sólidos, semisólidos y emulsiones líquidas e investigar sobre los efectos de dilución del flujo de saliva.

Durante los procesos que tienen lugar en la fabricación, los compuestos aromáticos que se encuentran originalmente en la materia prima, pueden ser eliminados o modificados, o bien pueden aparecer nuevas moléculas (Seuvre *et al.*, 2005). El aroma que se percibe de un alimento depende del equilibrio entre los diferentes volátiles, de su concentración y, también, de la matriz. La naturaleza química de los compuestos aromáticos y la composición y estructura de los productos alimenticios son las principales características que influyen en la transferencia entre el alimento y su liberación. En general, un alimento es multifásico porque contiene fases líquidas (acuosa o lipídica), sólidas y vapor. La distribución de un compuesto aromático dependerá de su afinidad por las diferentes fases y su percepción de la capacidad para liberarse en la fase vapor. La unión de aromas a macromoléculas o la formación de complejos, influyen en la partición entre el producto y la fase de vapor, ya que sólo los compuestos libres disueltos tienen presión de vapor (Hansson *et al.*, 2003). Morris (1987) sugiere que, más que a una unión directa, la disminución de la percepción del aroma es debida a la dificultad a la difusión que suponen las cadenas de macromoléculas; o sea que según este autor, a medida que aumenta la viscosidad, disminuye la difusión de moléculas volátiles y la percepción del aroma es menor. Contrariamente, en otro trabajo posterior, Malkki, *et al.* (1993), estudian las diferencias entre el tiempo y la intensidad de percepción del flavor de  $\alpha$ -pineno,

caproato de etilo, y ácido cinámico en soluciones con igual viscosidad y diferentes espesantes. Los autores concluyen que las diferencias de percepción se deben a las interacciones directas. En este sentido, Voilley *et al.* (1990) indican que las macromoléculas como los polisacáridos y proteínas pueden actuar como soporte de pequeñas moléculas como los aromas de forma reversible o irreversible (Harrison *et al.*, 1997; Charles-Bernard *et al.*, 2005a). Frecuentemente las interacciones físicas incluyen trampas hidrofóbicas, efecto *salting out*, interacciones químicas reversibles o uniones covalentes irreversibles (Charles-Bernard *et al.*, 2005b). Los carbohidratos cambian la volatilidad de los compuestos, pero dicho efecto depende de cada polisacárido y cada volátil en particular (Godshall, 1997): por regla general, los polisacáridos disminuyen la volatilidad de los compuestos en relación al agua, como resultado de interacciones moleculares no específicas; no obstante, monosacáridos y disacáridos tienen un efecto contrario llamado *salting-out* que incrementa la volatilidad relativa.

Roberts *et al.* (1996) describen como los compuestos más volátiles, están altamente afectados por un cambio de viscosidad del alimento, mientras que esto no afecta a los menos volátiles. Cada uno de los compuestos espesantes usados en el estudio de Roberts *et al.* (1996) (sacarosa, goma guar y carboximetilcelulosa) muestran un perfil de liberación de aromas diferente. Sin embargo, Hansson, *et al.* (2001) al añadir pectina altamente metoxilada a diferentes concentraciones, no encuentran generalmente un efecto en la liberación, por lo que concluyen que la viscosidad no tiene efecto, mientras que sí son determinantes la actividad de agua y el tipo de estabilizante.

Según Roberts *et al.* (1996) las interacciones entre carbohidratos y aroma, se deben a fenómenos de absorción, captación en microregiones, encapsulación y puentes de hidrógeno. Los polisacáridos pueden ligar volátiles de distintas formas. Algunos se basan en puentes de hidrógeno con determinados grupos funcionales;

otros, como el almidón, forman complejos de inclusión con volátiles hidrófobos. Las ciclodextrinas pueden captar algunos sabores y se han utilizado en la encapsulación de aromatizantes y para retener algunos *off-flavors* indeseables (Harrison y Hills, 1997). En definitiva, los hidrocoloides pueden retener físicamente los volátiles en la matriz mediante uniones específicas o no específicas (Guichard y Etiévant, 1998; van Ruth y King, 2003; Jouquand *et al.*, 2004). Van Ruth y King (2003) consideran que en condiciones de equilibrio los factores más determinantes son la longitud de la cadena y los grupos funcionales.

Normalmente los métodos usados para determinar la retención de los volátiles son el análisis del espacio de cabeza o métodos de equilibrio. Estos métodos permiten determinar la retención global de compuestos del aroma (Guichard y Etiévant, 1998). La microextracción en fase sólida, sirve para cuantificar la liberación de limoneno y mentol en una matriz de polisacáridos (Secouard *et al.*, 2003). Este estudio confirma los resultados de Roberts *et al.* (1996) donde se describe que tanto la viscosidad como las interacciones aroma-matriz deben ser tenidos en cuenta. A la vez, las características y particularmente la hidrofobicidad de los aromas juegan un papel importante en el comportamiento de retención/liberación de los aromas. Los complejos de inclusión hidrofóbicos, los enlaces de hidrógeno con moléculas de agua y los grupos hidroxilo de los polisacáridos aparecen como los mecanismos más probables. No obstante, los resultados del estudio pero no confirman estas afirmaciones ya que no se altera la liberación de aldehídos en un amplio rango de viscosidades. Por lo tanto no se puede asegurar que se establezcan interacciones moleculares ni efectos retardados de difusión entre los aldehídos y las pectinas durante la formación de geles de hidrocoloides en soluciones de pectinas. Posteriormente Rega *et al.* (2004) también utilizan SPME junto con análisis sensorial para determinar los volátiles del espacio de cabeza de distintos zumos de naranja elaborados en el laboratorio. En los cuales se

ha estudiado el papel de la materia suspendida en la percepción sensorial y en la liberación de aromas. Estos autores concluyen que los sólidos influyen en las propiedades reológicas y en la liberación de volátiles. En este caso, la turbidez exhibe una gran propiedad de retención de compuestos oxigenados probablemente debido a la formación de interacciones moleculares con las partículas que la forman. Ello comporta también cambios en la percepción sensorial de la textura, como la fluidez, olor, aroma y gusto.

Más recientemente se han publicado dos estudios sobre la interacción entre compuestos volátiles y no volátiles en matrices reales como el café (Charles-Bernard, *et al.*, 2005a y 2005b). Los componentes no volátiles del café, son carbohidratos, proteínas, ácidos de bajo peso molecular, y lípidos, entre otros. Muchos de estos compuestos muestran capacidad de atrapar física o químicamente compuestos aromáticos y esto puede estar implicado en la inestabilidad del aroma del café. A pesar de que los datos de la literatura indican que se producen interacciones entre polisacáridos de elevado peso molecular (mananos y arabinogalactanos) y compuestos volátiles, los autores encuentran una ligera interacción entre estos compuestos, pero no encuentran correlación entre el contenido en polisacáridos y la fuerza de las interacciones. El fraccionamiento de la materia no volátil según el peso molecular demuestra como las fracciones de menor peso molecular son más reactivas que las de mayor peso.

En el caso del vino, según Comuzzo *et al.* (2006) los extractos de levadura y sus autolisados influyen de forma decisiva en el aroma: pequeñas cantidades de células levaduras incrementan la volatilidad de algunos ésteres y el vino se percibe más floral y afrutado; sin embargo, altas dosificaciones aumentan los ácidos grasos en el espacio de cabeza del vino y se producen notas herbáceas, de panadería y de queso.

En conclusión, y según la bibliografía consultada, la retención de los volátiles aumenta según su peso molecular, el grupo funcional (alcoholes>cetonas y ésteres>ácidos), y disminuye con la polaridad y la volatilidad relativa. Los polisacáridos pueden actuar reteniendo los volátiles, facilitando la liberación o bien pueden no tener efecto alguno sobre los compuestos aromáticos. Asimismo, en los alimentos hay que tener en cuenta otros componentes como proteínas, lípidos e incluso sales minerales, que también pueden tener un papel sobre el aroma debido a la fuerza iónica que otorgan.

### **3 Metodología y Plan de trabajo**

### 3 Metodología y Plan de Trabajo

Para valorar la calidad organoléptica de una bebida, así como para detectar variaciones en la fracción volátil, que pueden suceder como consecuencia de la falta de homogeneidad en las materias primas y/o por la diversidad de prácticas tecnológicas, se requiere disponer de métodos analíticos fiables (objetivo planteado en el Capítulo 1). Estas técnicas deben reunir una serie de cualidades, como sencillez y rapidez en su ejecución, para que puedan ser incluidas entre los análisis rutinarios del control de calidad. También es importante que tengan capacidad discriminante para informar sobre cualquier modificación causada por el proceso de elaboración o de la materia prima. Asimismo, es deseable que los métodos sean económicos y respetuosos con el medio ambiente. Así pues, bajo estas premisas, la metodología y el plan de trabajo se ha organizado en las siguientes partes:

**PRIMERA PARTE.** Se ha caracterizado la composición volátil de bebidas derivadas de fruta, empleando un procedimiento analítico fácil, rápido, económico, discriminante e idóneo y que sea útil como herramienta para el control de calidad de las industrias productoras (apartado 3.1).

**SEGUNDA PARTE.** Para estudiar el efecto de los polisacáridos solubles en la fracción volátil, esta tesis se ha estructurado de la siguiente forma (apartado 3.2):

1. Adaptación de un método analítico para la determinación de pectinas y otros polisacáridos en las bebidas derivadas de fruta. Se ha puesto a punto un método de cromatografía de gel permeación (GPC) para cuantificar el contenido de los distintos polisacáridos de las bebidas según su masa molecular. Además, se ha comprobado la capacidad



discriminante de dicho método al aplicarlo a distintas muestras de fruta (apartado 3.2.1).

2. Se ha determinado la influencia de los polisacáridos en la fracción volátil, al comparar dicha fracción después de modificar el contenido polisacárido mediante enzimas pectolíticas. Para ello, se han utilizado dos tipos de enzimas, de extracción y de clarificación, sobre el mismo zumo de tres frutas diferentes (pera, melocotón y albaricoque) (apartado 3.2.2).

### **3.1 PRIMERA PARTE. Caracterización aromática por SPME**

Para el primer objetivo de esta tesis, determinar los compuestos volátiles característicos de zumos de fruta y vino, se ha planteado un método analítico que presenta una serie de ventajas respecto a los utilizados clásicamente. La microextracción en fase sólida se ha utilizado en numerosas aplicaciones, entre ellas la determinación del perfil volátil de todo tipo de alimentos (apartado 2.3.2). Este método cumple los requisitos que se necesitan para que pueda ser una herramienta útil para el control de calidad en las empresas productoras; es rápido, simple, económico y respetuoso con el medio ambiente, ya que prácticamente nunca requiere del uso de disolventes. Además, debería presentar capacidad discriminante, cualidad indispensable para detectar cualquier modificación de la calidad de la fruta.

#### **3.1.1 Aplicación de HS/SPME en zumos y néctares de fruta comerciales**

Con el fin de establecer cuáles son los volátiles característicos de bebidas derivadas de frutas, se ha determinado el perfil aromático de 33 zumos y néctares comerciales. Las muestras son de 3 frutas distintas: albaricoque (n=5), melocotón

(n=17) y pera (n=11); estas muestras se distinguen, por un lado, por sus características físico-químicas, puesto que pertenecen a especies botánicas diferentes, y, por otra parte, porque son de orígenes productivos variados. Incluso corresponden a tipos comerciales diferentes, convencionales y biológicos, lo que supone que han sido obtenidos a partir de distintos sistemas de elaboración. Para este objetivo se ha aplicado la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (*Headspace-Solid Phase Microextraction* HS/SPME) con una fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS) 100 $\mu$ m.

I- Se ha realizado una comprobación de la validez y fiabilidad del método elegido, mediante el cálculo de los factores de respuesta, linealidad, repetibilidad y límites de detección y cuantificación.

II- Se han identificado los compuestos volátiles de los zumos y néctares por Espectrometría de masas y tiempo de retención relativo.

III- Se ha realizado análisis estadístico multivariante, mediante el cual se pueda determinar la capacidad discriminante de la técnica elegida, de modo que, en función del perfil volátil obtenido, las muestras se diferencien según el tipo de fruta y la producción, convencional o biológica.

### **3.1.2 Aplicación de HS/SPME en vinos espumosos o cavas**

La técnica de extracción de HS/SPME aplicada en esta tesis doctoral no sólo debería discriminar frutas de distinto tipo y origen productivo, sino que también tendría que ser capaz de diferenciar por su fracción volátil muestras más homogéneas, como es el caso de un mismo cava que evoluciona durante el periodo de crianza. Como ya se ha mencionado en el apartado 2.2.2, el especial proceso de

elaboración del cava (*Método tradicional*) en contacto con las lías de la segunda fermentación en botella cerrada (Figura 2.3), le proporciona un *bouquet* particular.

Cabe señalar que en la bibliografía consultada existen muy pocos trabajos que estudien la evolución de los volátiles de los cavas de largo tiempo de crianza. Por ello, este trabajo pretende determinar el perfil aromático que adquiere el cava durante un largo tiempo de envejecimiento en contacto con las lías de la segunda fermentación (fase de rima), para caracterizar los compuestos volátiles en función del tiempo de crianza. Con esta finalidad, se dispone de dos series de cava, cuyos volátiles se analizan desde los 9 hasta los 27 meses. Hay que tener en cuenta que se han considerado cavas con más de dos años de crianza, para que hayan culminado la autólisis y hayan desarrollado un aroma de gran calidad (apartado 2.2.2). Durante el periodo estudiado, se han tomado seis botellas de cada cava y se han analizado con una frecuencia de tres meses de envejecimiento.

En lo que respecta al método SPME, para caracterizar los volátiles del cava en fase de rima, se han ensayado dos tipos de polímeros de extracción. Las grandes ventajas de la técnica de SPME para la extracción de compuestos volátiles de alimentos han favorecido el desarrollo de fibras de distinta polaridad (apartado 2.3.1). En este sentido, se han comercializado nuevas fibras que ofrecen características extractivas diferentes a la clásicamente utilizada, la PDMS. Por esa razón, en la aplicación de SPME en vino se ha planteado comparar el comportamiento de PDMS con otro recubrimiento compuesto por tres polímeros distintos: Divinilbenceno y Carboxen sobre Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), lo que puede resultar particularmente adecuado para la diferenciación de cavas con distinto tiempo en fase de rima, en función de los compuestos volátiles y semivolátiles.

I- Se ha ensayado la HS/SPME con dos fibras distintas, la PDMS y la triple (DVB/CAR/PDMS) en dos series de cava, para caracterizar cómo evolucionan los compuestos volátiles en función del tiempo.

II- Los datos se han tratado estadísticamente por métodos quimiométricos, para comprobar cual de las dos fibras tiene mayor capacidad discriminante.

### 3.2 SEGUNDA PARTE: Efecto de los polisacáridos solubles sobre los volátiles

En la segunda parte de esta tesis doctoral, se ha aplicado la cromatografía de gel permeación para determinar los polisacáridos solubles por peso molecular, para estudiar su influencia en el perfil de volátiles de bebidas derivadas de fruta.

Los métodos de determinación de los polisacáridos por peso molecular suelen ser largos, laboriosos y presentar múltiples etapas. Por ello, no resultarían útiles para ser aplicados como técnicas de control rutinario. El procedimiento escogido debe ser suficientemente sencillo y rápido para la determinación cuali y cuantitativa de los polisacáridos de distinta masa molecular. Para llevar a cabo esta parte del trabajo, se ha subdividido en dos apartados: por un lado, se ha propuesto un método de cromatografía de gel permeación (*Gel Permeation Chromatography*, GPC) para determinar polisacáridos de distinta masa molecular (3.2.1) y, por otro, en una segunda parte, se ha modificado el contenido en polisacáridos de diferente peso molecular de zumos de frutas mediante el uso de enzimas pectolíticas y se ha determinado su influencia en el perfil de volátiles (3.2.2). Como se ha mencionado en el apartado 2.4.2, la acción como soporte y retención de los compuestos aromáticos depende de la masa molecular de los polisacáridos solubles de la muestra. Por este motivo, se ha seleccionado un método de gel permeación para caracterizar el contenido de cadenas polisacáridicas presentes en los zumos de frutas. No obstante, la utilidad de este método en este estudio (que pueda reflejar el

uso de enzimas pectolíticos durante la elaboración de zumos) exige que la técnica de GPC demuestre suficiente sensibilidad como, por ejemplo, para determinar polisacáridos que puedan discriminar entre diversos tipos de derivados de frutas.

### 3.2.1 Determinación de los polisacáridos por Gel Permeación

Se ha escogido este tipo de cromatografía porque con anterioridad se ha utilizado con éxito para los polisacáridos de vino y es relativamente sencillo de aplicar. Este procedimiento, a diferencia de otros métodos de exclusión por tamaño, requiere poca cantidad de muestra.

En este tipo de cromatografía, la identificación de la masa molecular de los polisacáridos se basa en el tiempo de retención, ya que éste sigue un comportamiento característico: para tamaños intermedios la curva es lineal, mientras que las moléculas pequeñas o excesivamente grandes tienden a eluir juntas. Para establecer el modelo semilogarítmico que relaciona peso molecular con tiempo de retención, se requieren estándares con masas moleculares que abarquen las correspondientes a los polisacáridos problema. Existen pectinas comerciales, habitualmente de manzana, que se han utilizado como patrones, pero éstas abarcan un rango de tamaño muy estrecho que es insuficiente para obtener una correcta curva de calibración. A falta de estándares de referencia más apropiados, en esta tesis doctoral, se ha recurrido a los ácidos poliacrílicos, que están cargados negativamente como las pectinas de la fruta y de los cuales existen suficientes tamaños. La cuantificación de cada polisacárido se suele realizar por normalización. Sin embargo en el presente trabajo, la concentración de cada polisacárido se ha determinado en referencia a la cantidad de polisacáridos obtenida con el método

espectrofotométrico de Segarra *et al.* (1995), considerando que esta cifra corresponde al 100% de área.

### ***3.2.1.1 Aplicación a zumos y néctares comerciales***

Con el fin de estudiar la utilidad de un método de GPC para la determinación de polisacáridos solubles que permitan diferenciar entre distintas bebidas derivadas de frutas, se ha aplicado una técnica de GPC a 33 muestras de zumos y néctares comerciales de diferentes frutas (albaricoque, melocotón y pera), de las cuales un 40% son de origen biológico.

I- Se ha determinado el perfil de polisacáridos por peso molecular de las muestras de zumos y néctares comerciales.

II- Se ha aplicado análisis estadístico a los datos de los polisacáridos determinados, con la finalidad de observar la distribución de las muestras según el tipo de fruta y/o la producción, convencional o biológica.

### ***3.2.1.2 Aplicación a mosto de uva***

Se ha aplicado el método GPC a 20 mostos de una misma variedad (Parellada) ampliamente utilizada en la región Cava para la elaboración de este vino espumoso. Los 20 mostos se diferencian principalmente por el índice de maduración y la producción en la vid (Kg/Ha), factores que los enólogos consideran empíricamente que pueden ser determinantes para la calidad final del cava. Debido a sus características coloidales, los polisacáridos influirán en las propiedades sensoriales del vino o cava que se derive, aroma, color y propiedades espumantes.

I- Se ha aplicado el método de GPC a mostos procedentes de uvas con distinto rendimiento en el viñedo.

II- Además de la composición en polisacáridos se han determinado otros parámetros de control (pH, ° Brix, acidez total, polifenoles, proteínas, ácidos orgánicos y azúcares) por su influencia en la calidad del producto.

III- Se ha empleado el análisis multivariante con la finalidad de observar cómo las muestras se agrupan según sus características productivas y de calidad.

### 3.2.2 Efecto de los enzimas pectolíticos sobre la composición volátil

Por la bibliografía se sabe que la composición cualitativa y cuantitativa de polisacáridos puede modificar la percepción de los aromas. Diversos autores han descrito fenómenos de retención, tanto debidos a la propia viscosidad producida por las pectinas como a la existencia de enlaces entre los compuestos volátiles y la composición de la matriz (apartado 2.4.2). La mayoría de trabajos que estudian estos fenómenos se han realizado sobre soluciones modelo, no sobre matrices reales, debido a la gran dificultad que esto conlleva. El objetivo último de esta tesis es estudiar el grado de modificación de los compuestos volátiles tras la utilización de enzimas pectolíticos, bien para favorecer la obtención de zumo, o bien para mejorar y acelerar su clarificación y estabilidad.

Existen diversas clases de enzimas pectolíticos comerciales; todos ellos son preparados brutos con actividades enzimáticas concomitantes. Sin embargo, se pueden distinguir dos grandes tipos de acciones que caracterizan los siguientes enzimas:

*Pectinmetilesterasas*: hidrolizan los grupos ésteres metílicos dando lugar a la formación de metanol y pectinas de bajo metoxilo (*Low Methoxyl LM*), ácidos pectínicos y pécticos, que precipitan en presencia de calcio.

*Poligalacturonasas* y *pectinliasas*: enzimas que rompen los enlaces glucosídicos. Dependiendo del enzima tendrán un sustrato específico, actuarán en los enlaces de la parte exterior de la molécula (*exogalacturonasas*) o en la parte interior (*endopoligalacturonasas*). Los enzimas exo producen un aumento rápido del poder reductor y una disminución lenta de la viscosidad (al contrario de los endo que la producen rápida).

Tecnológicamente, la utilización de enzimas pectolíticos facilita el procesado en la producción de zumos. Su empleo durante la transformación tiene dos finalidades fundamentales: aumentar el rendimiento de extracción y favorecer la clarificación. De hecho, las pectinasas actúan rompiendo las pectinas de las paredes celulares y permiten obtener mayor cantidad de zumo. Por otro lado, las pectinasas ejercen su acción sobre las pectinas disueltas y en suspensión, liberando grupos ácidos libres. Éstos forman sales insolubles con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ , aglomeran las partículas y forman una red tridimensional, que precipita y produce una clarificación. En general, en la fabricación de zumos de fruta, el tratamiento con enzimas pectolíticos, mejora por una parte el rendimiento en el prensado y, por otra, facilita la clarificación de los zumos que requieren que no sean turbios (Primo Yúfera, 1998).

Con el fin de estudiar el grado de modificación de los compuestos volátiles tras la utilización de enzimas pectolíticos, se han elaborado en el laboratorio zumos de las mismas frutas cuya fracción volátil se había caracterizado previamente (apartado 3.1.1): albaricoque, melocotón y pera. Se han considerado dos variedades de pera (*Ercolini* y *Conference*), dos de melocotón (*Maria Bianca* y *Royal Glory*) y dos lotes de albaricoque *Galta Roja*.

A partir de cada una de las partidas de fruta se han obtenido tres zumos tras aplicar 3 tratamientos: el zumo control (sin tratamiento enzimático), y dos zumos



más, correspondientes a la aplicación de un enzima pectolítico extractivo y al uso de un enzima pectolítico clarificante (Figura 3.1). Los tratamientos se han repetido tres veces con cada variedad o lote de fruta para considerar las diferencias en la composición debidas a la variabilidad del procesado.

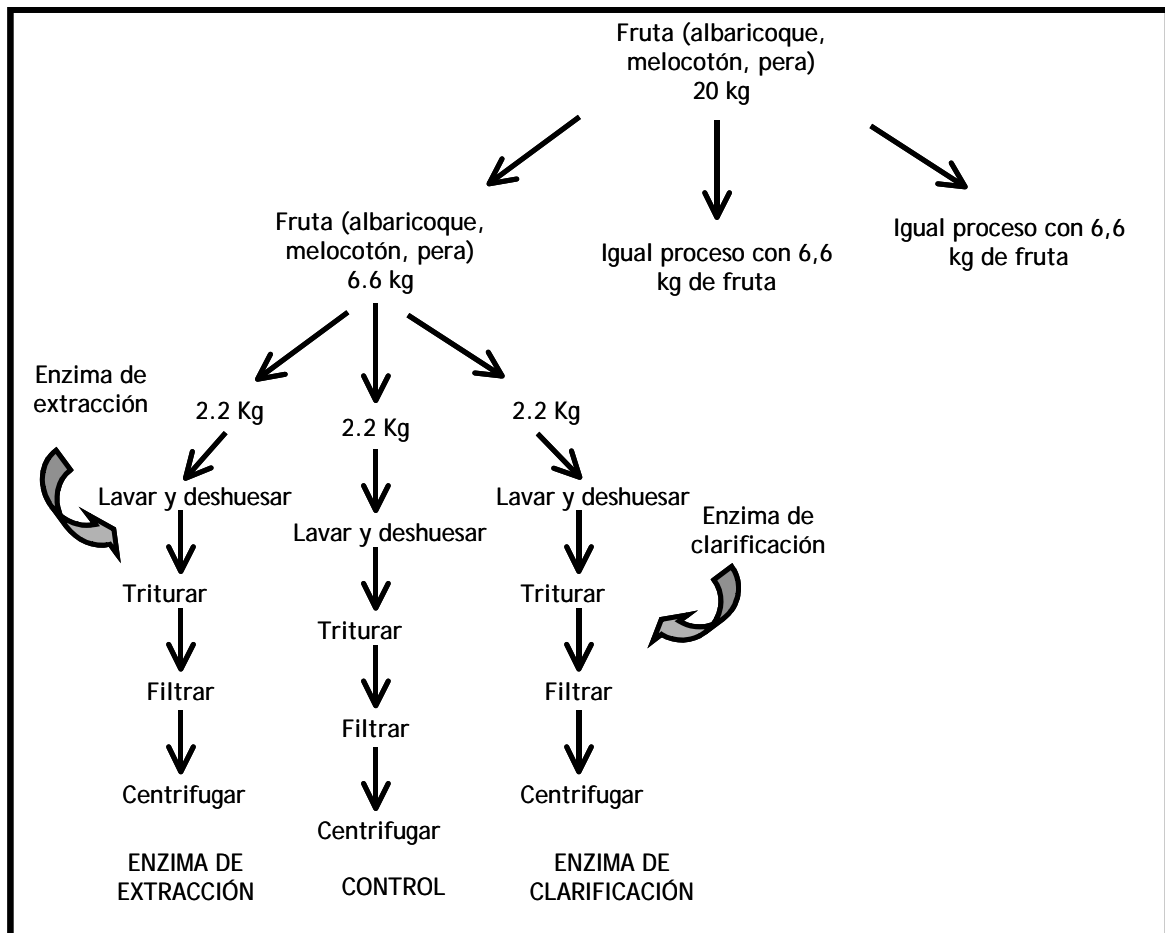


Figura 3.1: Esquema de la obtención de los zumos según los tratamientos enzimáticos aplicados.

El plan de trabajo seguido es el siguiente:

I- Una vez obtenidos los zumos, además de la composición en polisacáridos se han determinado otros parámetros de control (rendimiento de extracción, pH, ° Brix,

acidez, azúcares e índice de maduración) por su influencia en la calidad de los zumos y para observar el efecto que ejercen sobre ellos los enzimas pectolíticos.

II- Se ha determinado la composición volátil mediante HS/SPME para obtener el perfil respecto al tratamiento aplicado. En base a los resultados del apartado (3.1.2), la fibra utilizada ha sido la triple (DVB/CAR/PDMS).

II- Finalmente, mediante análisis estadístico se ha estudiado si los tratamientos aplicados sobre las frutas, a fin de facilitar la obtención del zumo, pueden afectar la composición volátil y en qué medida esto es debido al efecto que tienen los enzimas sobre los polisacáridos.

## 4 Resultados

## 4 Resultados

En este capítulo se exponen los resultados concretos en 5 publicaciones (4 en revistas de impacto y un acta de congreso) cada una de las cuales se corresponde con uno o varios aspectos de los objetivos planteados y están precedidas por un resumen.

### 4.1 PRIMERA PARTE: Caracterización aromática por HS/SPME y GC/MS

El primer objetivo de esta tesis es la caracterización aromática de bebidas derivadas de fruta alcohólicas y analcohólicas. Para dar respuesta a este objetivo, en la primera parte del trabajo, se resumen los resultados de la caracterización de la fracción volátil de zumos y néctares de frutas comerciales. Así como también, la puesta a punto y el estudio de fiabilidad del método HS/SPME empleado para este tipo de muestras (apartado 3.1.1).

La capacidad discriminante del método de SPME propuesto se ha confirmado al aplicarlo a muestras más homogéneas, como un mismo vino con distintos tiempos de envejecimiento. Además, en este estudio se ha utilizado la fibra clásica PDMS y otro polímero de aparición más reciente, la fibra triple DVB/CAR/PDMS, a fin de comparar sus propiedades extractivas (apartado 3.1.2).

#### 4.1.1 Caracterización de compuestos volátiles de zumos de fruta y néctares por HS/SPME y GC/MS

Publicación: M. Riu-Aumatell, M. Castellari, E. López-Tamames, S. Galassi, S. Buxaderas. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. Food Chem., 2004, 87, 627-637.

Se ha estudiado el perfil aromático de más de 30 muestras comerciales de albaricoque, melocotón y pera, con objeto de caracterizar distintos zumos y néctares comerciales. De las muestras incluidas en el ensayo no se conoce ni la variedad, ni el proceso industrial aplicado, pero sí se conoce el origen (Italia o España). A la vez, por reflejarse en el etiquetado, se sabe que un 40% de las muestras son de agricultura biológica y el resto convencionales. Para llevar a cabo el objetivo, se ha desarrollado un método de HS/SPME, como sistema de extracción de volátiles alternativo a los métodos tradicionales (la extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida, el espacio de cabeza dinámico o la destilación al vacío), mucho más caros, largos y laboriosos.

Como tipo de fibra de SPME, se utilizó la más habitual hasta el momento, la polidimetilsiloxano (PDMS), una fibra de carácter apolar pero útil para obtener perfiles de volátiles. Para la identificación se ha acudido a la espectrometría de masas, a la referencia de patrones standard, a los índices de Kovats e, incluso, a su previa descripción en la bibliografía consultada.

Se han calculado los factores de respuesta, los límites de detección y cuantificación y la repetibilidad del método. Estos resultados muestran que la técnica es satisfactoria. Tras la aplicación del método se han obtenido los correspondientes perfiles de volátiles y se ha observado una gran variabilidad entre muestras de la misma fruta. Esto puede ser debido a la heterogeneidad de los zumos

y néctares analizados, de distinto origen comercial (no se conoce la variedad ni las características de las materias primas, ni el tratamiento tecnológico aplicado) y, en el caso de los néctares, a la diferente formulación.

Entre los resultados obtenidos, también destaca que prácticamente no se hayan determinado aldehídos y alcoholes de 6 átomos de carbono, ampliamente descritos en la bibliografía. Esto puede ser debido, probablemente, a que la fibra de PDMS utilizada no sea la más adecuada para extraer este tipo de compuestos. Esta afirmación se podría apoyar en el hecho de que estos compuestos son polares y sus factores de respuesta absolutos fueron muy bajos.

El perfil de los zumos de albaricoque destaca por la presencia de un amplio rango de compuestos, principalmente, de tipo naftaleno (descritos por primera vez en este estudio), lactonas y terpenos. El albaricoque es una fruta que no se caracteriza por un tipo de compuestos impacto, sino que su perfil volátil está formado por una extensa clase de familias químicas y esto se mantiene en los zumos comerciales.

En las muestras de melocotón sólo la  $\gamma$ -decalactona se encuentra en todos los zumos analizados, lo que confirmaría que este compuesto es el que marca el impacto sensorial de esta fruta, junto con otras lactonas, derivados del naftaleno y terpenos.

En el aroma de la pera, el acetato de hexilo y el E2,Z4-decadienoato de etilo se encuentran en todas las muestras estudiadas, apareciendo como caracterizadores, y el perfil está mayoritariamente compuesto por ésteres de etilo y acetatos.

Se ha realizado el análisis discriminante con los compuestos más representativos de cada tipo de fruta, albaricoque, melocotón y pera. Los resultados confirman que el perfil obtenido con el método de HS/SPME es útil para discriminar muestras según el tipo de fruta y que puede proponerse como técnica para el control de calidad de la industria transformadora. En este sentido, además, el análisis discriminante muestra que los volátiles extraídos por SPME pueden diferenciar las

frutas en función del tipo de producción, orgánica o convencional. En definitiva, la técnica de extracción de SPME, utilizando la fibra PDMS y bajo las condiciones experimentales ensayadas en este estudio, sería adecuada para caracterizar los volátiles de los zumos y néctares de frutas y para discriminar entre diferentes modos de cultivo y elaboración. Además, estos resultados preliminares permiten suponer que algunos compuestos, o bien algún grupo determinado de compuestos, pueda ser útil para identificar marcadores potenciales según el tipo de agricultura de procedencia.

Analytical, Nutritional and Clinical Methods

## Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS

M. Riu-Aumatell <sup>a</sup>, M. Castellari <sup>b</sup>, E. López-Tamames <sup>a</sup>, S. Galassi <sup>c</sup>, S. Buxaderas <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Facultat de Farmàcia, Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n, 08028 Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *IRTA-Food Chemistry Unit, Granja Camps i Amet, s/n, 17121 Monells, Girona, Spain*

<sup>c</sup> *Università di Bologna – Facoltà di Agraria, Dipartimento di Scienze degli Alimenti, sede di Cesena, Via Ravennate 1020, 47023 Cesena, Italy*

Received 4 June 2003; received in revised form 18 December 2003; accepted 18 December 2003

### Abstract

Here we described a rapid evaluation of volatile profiles of several commercial fruit juices (pear, apricot and peach) by head-space-solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry (HS-SPME and GC/MS). This method allows to analyse a wide range of flavour compounds (97 esters, aldehydes, alcohols, terpenoids, lactones, and isoprene derivatives) and is a rapid, easy and inexpensive procedure. In addition, this is the first study to report the detection of several norisoprenoids (mainly naphthalenes) that characterised apricot and peach juices. Moreover, by means of volatile compounds it could be possible to distinguish between juices of organic and conventional production and juices with flavourings added.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Pear; Peach and apricot nectar; HS-SPME; Aroma profile; Norisoprenoids; Organic agriculture

### 1. Introduction

Volatiles directly affect the sensorial quality of fresh and processed fruit products, the aroma of which is formed by a complex group of chemical substances (e.g., aldehydes, alcohols, ketones, esters, lactones, terpenes). The concentration of these volatile compounds is generally low ( $\mu\text{g/L}$ ) and can be affected by a number of agronomic (variety, climatological conditions, ripening stage) (Douillard & Guichard, 1990; Rizzolo, Polesello, & Polesello, 1992; Vendramini & Trugo, 2000; Visai & Vanoli, 1997) and technological (harvest, post-harvest treatments, storage and processing conditions) factors (Botondi, DeSantis, Bellicontro, Vizovitis, & Mencarelli, 2003; Douillard & Guichard, 1990; Lambert, Demazeau, Largeteau, & Bouvier, 1999; Lin, Rouseff, Barros, & Naim, 2002; Mawele Shamaila, Powrie, & Skura, 1992; Rizzolo et al., 1992). Fruit juices are specifically defined in the council directive 2001/112/EC, which can be summarised as being 100% pure fruit juice

without preservatives. Fruit nectar are fermentable but unfermented product obtained by adding water and sugars and/or honey to the fruit juices, fruit juices from concentrate, concentrated fruit juices, or fruit purée or to a mixture of those products. The addition of sugars and/or honey is permitted up to 20% of the total weight of the finished product. Moreover, organic food can be defined as the product of a farming system which avoids the use of man-made fertilisers, pesticides, growth regulators and livestock feed additives (Regulation (EEC) No. 2092/91). According to the Regulation (EEC) No. 223/2003 the feed materials from organic production method were comprised of organically-produced at least 95% of the product's dry matter.

Therefore the production–transformation chain of fruits and derivatives requires simple and high-throughput analytical procedures which allow the characterisation of volatile profiles. A rapid analysis of aroma constituents may improve the standardisation of quality and provide a relationship between sensorial and volatile contents. Various studies have evaluated the volatile compounds of fresh fruits (Derail, Hofmann, & Schieberle, 1999; Gomez & Ledbetter, 1997; Guichard,

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-4024510; fax: +34-93-4035931.  
E-mail address: [susana@farmacia.far.ub.es](mailto:susana@farmacia.far.ub.es) (S. Buxaderas).



1988; Horvat & Chapman, 1990; Narain, Hsieh, & Johnson, 1990; Suwanagul & Richardson, 1998a; Suwanagul & Richardson, 1998b; Visai & Vanoli, 1997); however, the analytical methods used are not practical for quality control purposes.

Solid phase microextraction (SPME) involves the adsorption of analytes onto a fused silica fibre coated with suitable stationary phases and their subsequent desorption immediately before chromatographic analysis (Arthur & Pawliszyn, 1990; Pawliszyn, 2000; Zhang & Pawliszyn, 1993). The target analytes can be adsorbed on the fibre by immersing it in the sample or by exposing it to the sample headspace (HS-SPME), in which case matrix interferences can be drastically reduced. HS-SPME is a promising technique for the evaluation of the aroma profile of apple (Matich, Rowan, & Banks, 1996; Song, Gardner, Holland, & Beaudry, 1997; Song, Fan, & Beaudry, 1998) and strawberries, raspberries, blackberries, mango and banana (Ibañez, López-Sebastián, Ramos, Tabera, & Reglero, 1998) and fruit juices such as orange (Jia, Zhang, & Min, 1998; Steffen & Pawliszyn, 1996) and tomato (Servili, Selvaggini, Taticchi, Begliomini, & Montedoro, 2000).

Here, we developed a rapid HS-SPME-GC method to measure the volatile compounds of several commercial nectars and fruit juices of peach, pear and apricot, in order to characterise their aroma profile. HS-SPME could be a particularly useful alternative to other tedious or expensive extraction methods, such as liquid–liquid extraction (Di Cesare, Nani, Mariani, & D'Angelo, 1996), solid phase extraction (SPE) (Polesello, Di Cesare, & Nani, 1989), vacuum distillation (Derail et al., 1999; Gomez & Ledbetter, 1997; Guichard, 1988; Guichard, Schlich, & Issanchou, 1990; Horvat & Chapman, 1990), and dynamic headspace (Narain et al., 1990; Suwanagul & Richardson, 1998a; Visai & Vanoli, 1997). The commercial samples used in this study were purchased from Italy and Spain (two of the largest producers of fruit and derivatives in Europe) and some were organically-produced in order to enlarge the data base on aroma composition of nectars and juices.

## 2. Experimental

### 2.1. Samples

Thirty-three samples of juice (5 apricot, 11 pear and 17 peach) were analysed. All samples of pear and peach juice were purchased from commercial establishments in Italy and Spain, while apricot juice was only from Italy. 40% of the samples were organic agricultural products. Table 1 showed the characteristics of the samples.

### 2.2. Chemicals

A model juice made up of 110 g/L of saccharose, 4 g/L of citric acid and 1 L of double distilled water was prepared.

An internal standard solution (IS) of nonanoic acid ethyl ester, 95% purity (Fluka, St. Louis, MO, USA) in methanol (SDS, Peypin, France) was prepared at a concentration of 100 mg/L.

Standard solutions of limonene, ethyl esters of octanoate, decanoate and dodecanoate, hexyl acetate, 2-octanol, benzaldehyde, linalool,  $\alpha$ -terpineol, geraniol, and  $\gamma$ -butyrolactone (Sigma, St. Louis, MO, USA) and ethyl esters of hexanoate, nonanoate, tetradecanoate, 1-hexanol and 2-phenylethanal (Fluka, St. Louis, MO, USA) were prepared in methanol (SDS, Peypin, France).

### 2.3. Analytical procedure

An SPME device (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a 10 mm fibre coated with 100  $\mu$ m polydimethylsiloxane was used for the extraction. A 5 ml juice sample, previously added to 5  $\mu$ L of IS solution, was put in a 10 ml vial (Reference 27385, Supelco, Bellefonte, PA, USA) and extraction was performed by headspace mode (with a distance from the liquid surface of 20 mm) at 40 °C for 30 min with magnetic stirring (700g). After extraction, the SPME device was introduced in a Gas Chromatograph (GC) splitless injector and maintained at 250 °C for 5 min. Each day the fibre was activated by inserting it into the GC injector at 250 °C for 30 min.

Semiquantitative measurements were carried out using a Hewlett–Packard (Palo Alto, CA, USA) 5890A gas chromatograph equipped with flame ionisation detector (FID). The capillary column was a Supelcowax (Bellefonte, PA, USA) 10 with PEG 20M stationary phase (30 mm  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m). Helium was used as a carrier gas. The injector and detector temperatures were 250 and 280 °C respectively. The temperature program was from 60 °C (held for 5 min) to 240 °C (held for 10 min) at 3 °C/min using splitless injection mode. The results were expressed as follows:

$$\frac{\text{Peak area}}{\text{Internal Standard (IS) area}} \times 1000.$$

Volatile compounds were identified with a HP5971A quadropole mass selective detector. Mass spectral ionisation was set at 180 °C. The mass spectrometer was operated in the electron ionisation mode at a voltage of 70 eV. The same temperature program as described above was used.

Volatile components were identified by comparing a private library spectra built with chemical standards and two spectral libraries (NIST/EPA/MSDC 49K Mass

Table 1  
Code samples and chemical characteristics according to the label of the commercial fruit nectars and juices

	Fruit	pH	°Brix	Product type <sup>A</sup>	% Fruit	Production <sup>B</sup>	Ascorbic acid	Citric acid	Lemon juice	Grape juice	Agave juice	Apple juice	Flavourings	Sugar <sup>C</sup> added
A1	Apricot	3.43	15.3	n	40	c	+	–	–	–	–	–	–	g, s
A2	Apricot	3.49	16.2	n	45	c	+	–	–	–	–	–	+	s
A3	Apricot	3.48	15.2	n	45	c	+	–	–	–	–	–	–	g, s
A4	Apricot	3.42	15.3	n	40	o	+	–	–	–	–	–	–	g, s
A5	Apricot	3.40	16.2	n	45	o	+	–	–	–	–	–	–	s
R1	Pear	3.57	14.4	n	50	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
R2	Pear	3.68	15.1	n	50	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
R3	Pear	3.89	15.4	n	50	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
R4	Pear	3.58	13.8	n	55	c	+	+	–	–	–	–	+	s
R5	Pear	3.56	11.3	n	50	c	–	–	+	–	–	–	–	f
R6	Pear	3.60	11.3	j	100	c	–	–	–	–	–	–	–	–
R7	Pear	3.70	12.3	j	100	o	–	–	–	–	–	–	–	–
R8	Pear	3.77	14.8	n	50	o	+	+	–	–	–	–	–	s
R9	Pear	3.70	10.8	n	55	o	–	–	+	–	+	–	–	–
R10	Pear	3.69	14.8	n	>50	o	–	–	+	–	–	+	–	–
R11	Pear	3.91	15.2	n	50	o	+	+	–	–	–	–	–	s
P1	Peach	3.68	14.7	n	45	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
P2	Peach	3.65	15.9	n	45	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
P3	Peach	3.43	14.8	n	50	c	+	+	–	–	–	–	+	s
P4	Peach	3.80	15.4	n	45	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
P5	Peach	3.30	9.3	n	>50	c	–	–	+	–	–	–	–	f
P6	Peach	3.58	13.9	n	45	c	+	–	+	–	–	–	–	s
P7	Peach	3.49	5.8	n	50	c	+	+	–	–	–	–	–	a
P8	Peach	3.83	11.9	n	45	c	+	+	–	–	–	–	–	g, s
P9	Peach	4.04	15.3	n	45	c	+	+	–	–	–	–	–	a
P10	Peach	3.90	12.4	j	100	c	–	–	–	+	–	–	–	–
P11	Peach	3.63	12.4	j	100	c	–	–	–	+	–	–	–	–
P12	Peach	3.78	10.4	n	50	o	–	–	+	–	+	–	–	–
P13	Peach	3.75	15.4	n	45	o	+	+	–	–	–	–	–	s
P14	Peach	3.71	13.3	n	45	o	–	–	+	–	+	–	–	–
P15	Peach	3.71	13.8	n	>50	o	–	–	+	–	–	+	–	–
P16	Peach	3.70	13.8	n	>50	o	–	–	–	–	–	+	–	–
P17	Peach	3.79	15.7	n	45	o	+	+	–	–	–	–	–	s

+, the compound in the row was present in the sample; –, the compound in the row was not in the sample; A (n, fruit nectar; j, fruit juice); B (c, conventional production; o, organic production) C (g, glucose syrup; s, sucrose; f, fructose; a, artificial).

Spectral Database, Hewlett–Packard Co., Palo Alto, CA, USA and Registry of Mass Spectral Data with Structures, Wiley 6.1, NY, USA). When available, MS identifications were confirmed by comparing GC retention times with pure standards. We also used the injection of retention index standards (Sigma, St. Louis, MO, USA) of C<sub>8</sub> to C<sub>32</sub> aliphatic hydrocarbons dissolved in methanol to calculate the Kovats-type gas chromatographic retention indices in Carbowax phase (PEG) and Silicone phase [using a SPB-1<sup>TM</sup> column with Fused Silica stationary phase (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)] (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

#### 2.4. Absolute response factors

Five millilitre of model solution were spiked with three different quantities of the standard solutions (Table 2). Then these solutions were extracted three times by HS-SPME, as described above. The concentration range of these standard solutions was chosen to obtain area responses that included those obtained from fruit juices.

#### 2.5. Detection and quantification limits

Detection and quantification limits were determined according to the method of U.S.P. XII (1989). Five millilitre of model solution spiked with 5 μL of IS was analysed seven times following the analytical procedure described. In each blank, 10 signal noises around the integration zone (corresponding to each standard used to calculate the absolute response factors) were studied. Peaks from the fibre were not taken into account (100 *m/z*). The mean of signal noises was transformed as concentration using the internal standard area value. For each compound the limit of detection (LD) was

calculated as three times the concentration corresponding to signal noise ratio, and the limit of quantification (LQ) as 10 times the signal noise ratio (Table 2).

#### 2.6. Repeatability

All juices were analysed three times following the procedure described above. Repeatability was expressed as the coefficient of variation of the three measurements. The precision of analysis was 14% for compounds with a relative area lower than 1000 and 7% for those with a relative area higher than 1000.

#### 2.7. Statistical procedures

Discriminant analysis was carried out with the aroma compounds that had median value and also, it was performed to discriminate samples of organic agriculture from those of conventional production. The Statgraphics Plus 4.1 (1999) program was used.

### 3. Results and discussion

Figs. 1–3 showed the GC-FID volatile profile of apricot, peach and pear juice, respectively obtained by CW column. The peak numbers in the chromatograms corresponded to the compounds listed in Tables 3–5, respectively. The aroma compounds were numbered according to their retention time by CW column. These tables showed the Kovats Indexes obtained with CW column and using the SPB-1 column to confirm the identity of the aroma, the identification method (retention time and/or mass spectrum) and the compounds, which were previously reported in the literature using other methods. Some of the compounds were not iden-

Table 2  
Absolute response factors of standards, concentration intervals, linearity (*r*), and limits of detection and quantification

	Concentration interval μg/L ( <i>n</i> = 9)	Absolute response factor slope ( <i>a</i> )	<i>r</i> ( <i>p</i> < 0.001)	LD μg/L	LQ μg/L
Limonene	0.12–0.5	957,146	0.999	0.2	0.8
Ethyl hexanoate	20–80	1947	0.998	0.2	0.4
Hexyl acetate	1–5	189,323	0.996	0.2	0.4
1-Hexanol	60–240	2915	0.998	0.2	0.6
Ethyl octanoate	20–80	32,518	0.995	0.2	0.6
Ethyl nonanoate (IS)	2–8	651,984	0.995	0.2	0.5
Benzaldehyde	2–6	77,844	0.954	0.2	0.8
Linalool	14–55	61,432	0.998	0.8	2.2
2-Octanol	4–14	35,413	0.999	0.2	0.6
Ethyl decanoate	20–80	13,206	0.997	0.4	1.2
α-Terpineol	10–40	27,306	0.998	0.4	1.2
Geraniol	3–12	41,880	0.999	1.8	4.6
Ethyl dodecanoate	20–80	47,439	0.998	0.6	1.4
Ethyl tetradecanoate	20–80	22,973	0.993	1.6	4.2
2-Phenylethanal	10–40	9486	0.931	0.8	2.2
γ-Butyrolactone	10–40	979	0.992	0.4	0.8

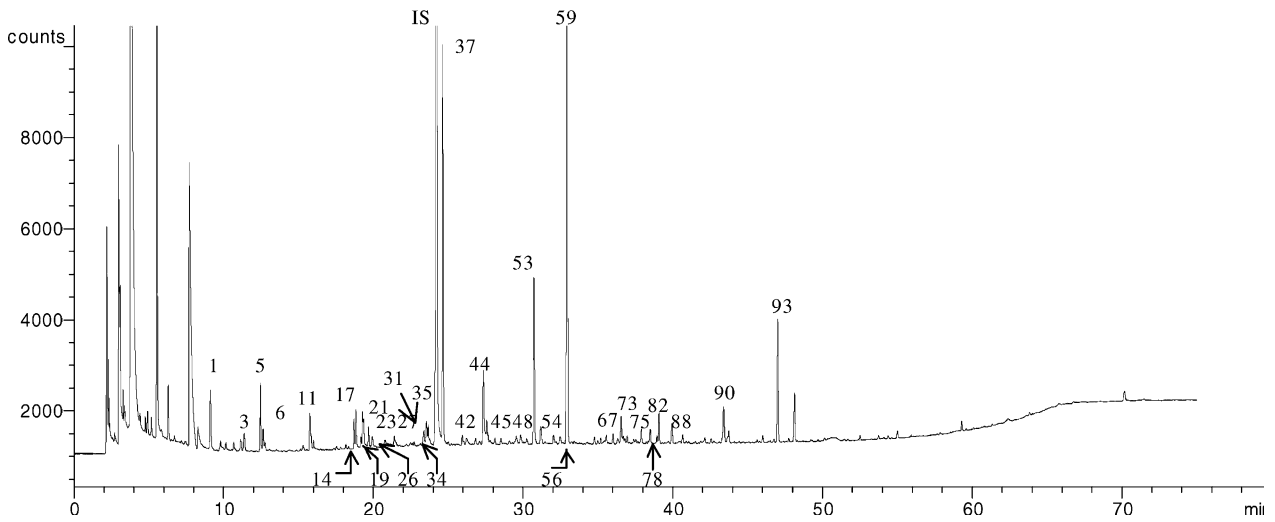


Fig. 1. Chromatogram of apricot sample obtained by CW column and FID detector. Peak numbers correspond to the compounds listed in Table 3.

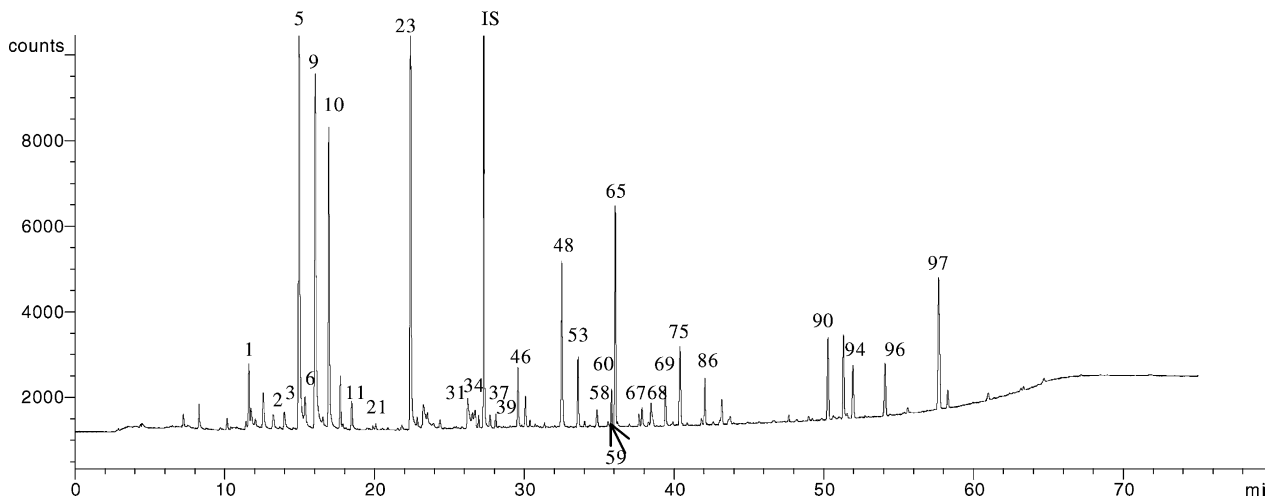


Fig. 2. Chromatogram of peach sample obtained by CW column and FID detector. Peak numbers correspond to the compounds listed in Table 4.

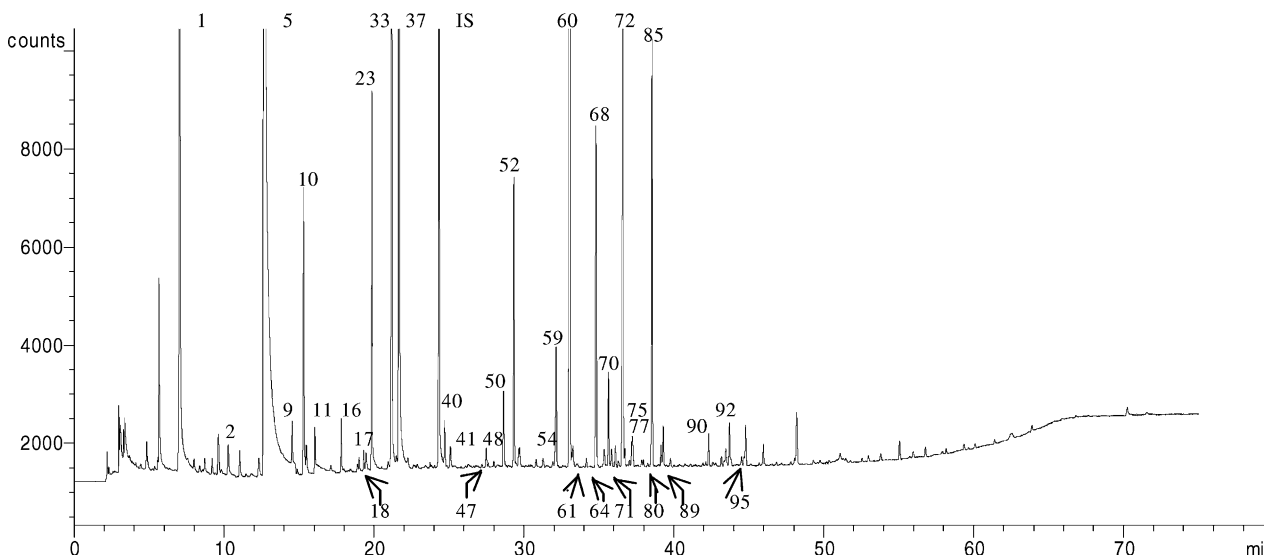


Fig. 3. Chromatogram of pear sample obtained by CW column and FID detector. Peak numbers correspond to the compounds listed in Table 5.

Table 3  
Volatile compounds of apricot juice

		KI <sup>a</sup> Cw <sup>b</sup> phase	KI SPB-1 <sup>c</sup> phase	Id. <sup>d</sup>	Ref. <sup>e</sup>	Mean <sup>f</sup>	Standard deviation <sup>f</sup>	No. samples <sup>g</sup>
1	Limonene	1206	1017	A,B	[4,6,7]	54	92	4
3	$\beta$ -Ocimene	1250	1038	B	[4]	13	14	4
4	Isoamylbutyrate <sup>h</sup>	1259	1042	B		13	27	1
5	Hexyl acetate	1262	997	A,B	[1,3]	7	14	1
6	$\alpha$ -Terpinolene	1287	1074	B	[4]	35	55	5
7	Isoamylvalerate <sup>h</sup>	1287	1091	B		22	45	1
11	1-Hexanol	1339	858	A,B	[2,4,6,7]	22	13	5
14	Butyl hexanoate <sup>h</sup>	1350	1174	B		3	6	1
17	Hexyl butyrate <sup>h</sup>	1398	1175	B		5	8	3
19	Hexyl isovalerate <sup>h</sup>	1424	1068	B		21	6	5
21	3,8,8-Trimethyltetrahydro naphthalene <sup>h</sup>	1424	1000	B		5	4	3
22	1,2,3,4-Tetrahydro-1,1, 6-trimethylnaphthalene	1425	1117	B	[6]	3	7	1
23	Ethyl octanoate	1428	1180	A,B	[2]	6	5	3
26	Acetic acid	1465	1137	A,B	[4,6]	14	9	5
27	Unknown peak 1	1465	1137			4	4	3
28	2-Furancarboxyaldehyde	1467	815	B	[6]	14	27	2
31	Vitispirane <sup>h</sup>	1505	1260	B		8	10	3
32	Unknown peak 2	1505	1075			39	64	3
34	Benzaldehyde	1508	926	A,B	[1–4,6,7]	6	8	2
35	Unknown peak 3	1511	1122			35	45	5
37	Linalool	1537	1083	A,B	[1–7]	75	73	5
42	Unknown peak 4	1568	1275			25	38	3
44	Hexyl hexanoate <sup>h</sup>	1599	1268	B		10	20	1
45	Megastigma-4,6,8-triene <sup>h</sup>	1604	1147	B		45	61	4
48	Ethyl decanoate	1656	1375	A,B		17	20	5
53	$\alpha$ -Terpineol	1661	1166	A,B	[2,4,6,7]	95	71	5
54	$\alpha$ (Z,E)-Farnesene <sup>h</sup>	1692	941	B		12	7	5
56	1,2-Dihydro,1,1, 6-trimethyl- naphthalene	1717	1474	B	[6]	6	8	4
59	$\alpha$ (E,E)-Farnesene	1740	1492	B	[4]	146	291	4
67	Geraniol	1797	1234	A,B	[2,4–7]	5	7	2
73	Unknown peak 5	1836	1424			15	21	4
75	Ethyl dodecanoate	1844	1582	A,B		10	12	5
78	Unknown peak 6	1869	1558			15	15	4
82	$\beta$ -Ionone	1924	1454	A,B	[4,6,7]	22	24	4
88	Cinnamaldehyde <sup>h</sup>	1996	1506	B		35	17	5
90	Ethyl tetradecanoate	2027	1780	A,B		1	3	1
93	$\gamma$ -Decalactone	2101	1418	B	[1,3,6,7]	29	31	4

[1] Guichard (1988); [2] Polesello et al. (1989); [3] Guichard et al. (1990); [4] Chung, Eiserich, and Shibamoto (1993); [5] Nishimura (1995); [6] Di Cesare et al. (1996); [7] Gomez and Ledbetter (1997).

<sup>a</sup> Kovats Index.

<sup>b</sup> Carbowax phase.

<sup>c</sup> Silicone phase.

<sup>d</sup> Identification (A, retention time, B, mass spectrometry).

<sup>e</sup> References.

<sup>f</sup> (Peak area/IS area)  $\times$  1000.

<sup>g</sup> Number of samples where the compound was found.

<sup>h</sup> Tentatively identified.

tified by retention time or MS and were included in the tables as unknown peaks with Kovats Indexes. These compounds were analysed in the study because they were found in most of the samples and were not impurities of the fibre (100 *m/z*). We detected 37 compounds in apricot juice, 60 in peach juice and 49 in pear juice. More compounds were found in our juice samples (Tables 3–5) than in other studies for fresh fruits (Derail

et al., 1999; Di Cesare et al., 1996; Gomez & Ledbetter, 1997; Guichard, 1988; Guichard et al., 1990; Horvat & Chapman, 1990; Narain et al., 1990; Polesello et al., 1989; Suwanagul & Richardson, 1998a, 1998b; Visai & Vanoli, 1997). This may be due to the different fruit characteristics (e.g., varieties, ripening, origin) and to the distinct treatments used for juice extraction (e.g., enzymes, heat, filtration). The heterogeneity of the

Table 4  
Volatile compounds of peach juice

		KI <sup>a</sup> Cw <sup>b</sup> phase	KI SPB-1 <sup>c</sup> phase	Id. <sup>d</sup>	Ref. <sup>e</sup>	Mean <sup>f</sup>	Standard deviation <sup>f</sup>	No. samples <sup>g</sup>
1	Limonene	1206	1017	A,B	[3,4]	4601	9714	12
2	Ethyl hexanoate	1223	982	A,B		2	10	1
3	$\beta$ -Ocimene	1250	1038	B	[4]	15	47	4
5	Hexyl acetate	1262	997	A,B	[1,3,6]	385	891	7
6	$\alpha$ -Terpinolene	1287	1074	B	[4,6]	1	4	1
8	$\gamma$ -Terpinene	1291	1057	B	[4,6]	128	509	3
9	3-Hexenyl acetate	1300	988	B	[2,3]	102	240	4
10	2-Hexenyl acetate	1315	997	B	[3,6]	8	27	3
11	1-Hexanol	1316	858	A,B	[3,4,6]	11	22	6
12	Acetoin	1336	1007	B	[6]	56	231	1
13	Unknown peak 1	1339	1000			22	55	7
14	Butyl hexanoate <sup>h</sup>	1388	1174	B		24	82	2
17	Hexyl butyrate <sup>h</sup>	1410	1175	B		3	11	1
20	Octyl acetate	1424	1193	A,B		26	56	6
21	3,8,8-Trimethyltetrahydro- naphthalene <sup>h</sup>	1424	1000	B		69	223	3
23	Ethyl octanoate	1428	1180	A,B	[3]	196	417	11
24	3-Hexenol	1434	847	A,B	[2–4,6,7]	3	7	3
25	1,2,3,4-Tetrahydro-1,6-dimeth- yl-4-(1-methylethyl) naphtha- lene <sup>h</sup>	1435	1518	B		21	83	3
26	Acetic acid	1465	1137	A,B	[4,5]	237	769	5
28	2-Furancarboxyaldehyde	1467	815	B	[3]	2	3	5
29	2-Methylethyl octanoate <sup>h</sup>	1471	1178	B		46	86	7
30	3-Hexenyl isobutyrate	1504	1275	B	[2]	14	33	4
31	Vitispirane <sup>h</sup>	1505	1260	B		9	31	2
34	Benzaldehyde	1508	926	A,B	[1–4,6]	17	41	5
36	Trimethyltetrahydronaphtha- lene <sup>h</sup>	1520	1068	B		71	202	4
37	Linalool	1537	1083	A,B	[4–7]	156	301	12
38	Caryophyllene	1537	1246	B	[4]	4	15	1
39	1,2,3,4-Tetrahydro-1,1,6-tri- methyl naphthalene <sup>h</sup>	1545	1255	B		13	38	4
44	Hexyl hexanoate <sup>h</sup>	1599	1268	B		4	11	3
46	1,2,3,4-Tetrahydro-1,6,8-tri- methyl naphthalene <sup>h</sup>	1610	1239	B		102	292	3
48	Ethyl decanoate	1624	1378	A,B		31	69	7
49	Citronellyl acetate	1645	1335	B	[5]	8	22	3
51	Unknown peak 2	1656	1375			51	164	5
53	$\alpha$ -Terpineol	1661	1166	A,B	[4]	112	171	13
54	$\alpha$ (Z, E)-Farnesene <sup>h</sup>	1692	941	B		12	24	6
57	Ethyl benzoate	1728	1154	B	[2,3]	5	19	1
58	Estragole <sup>h</sup>	1728	1170	B		84	267	2
59	$\alpha$ (E, E)-Farnesene	1740	1492	B	[4]	170	250	11
60	Geranyl acetate <sup>h</sup>	1745	1360	B		81	226	4
62	1,2,4a,5,8,8a-Hexahydro-4,7- dimethyl-1-(1-methylethyl) naphthalene <sup>h</sup>	1761	1524	B		1	5	1
65	Benzyl acetate <sup>h</sup>	1788	1131	B		88	236	5
66	Neryl acetate <sup>h</sup>	1789	1345	B		98	349	3
67	Geraniol	1797	1234	A,B	[4]	51	91	8
68	$\beta$ -Damascenone	1806	1354	B	[7]	13	38	3
69	1,2-Dihydro-1,4,6-trimethyl- naphthalene <sup>h</sup>	1809	1233	B		7	18	4
70	Anethole	1809	1254	B		5	17	2
72	Ethyl 2,4 (E, Z)-decadienoate <sup>h</sup>	1832	1443	B		13	42	3
75	Ethyl dodecanoate	1844	1558	A,B		10	32	4
76	$\alpha$ -Ionone	1857	1416	A,B		0	1	1
81	Damascenone A <sup>h</sup>	1891	1476	B		46	93	4
82	$\beta$ -Ionone	1924	1454	A,B	[4]	44	138	3
83	2-Ethyl hexanoate <sup>h</sup>	1932	1717	B		0	0	1
86	Methyl tetradecanoate	1990	1707	A,B		1	4	2

Table 4 (continued)

		KI <sup>a</sup> Cw <sup>b</sup> phase	KI SPB-1 <sup>c</sup> phase	Id. <sup>d</sup>	Ref. <sup>e</sup>	Mean <sup>f</sup>	Standard deviation <sup>f</sup>	No. samples <sup>g</sup>
88	Cinnamaldehyde <sup>h</sup>	1996	1506	B		76	134	16
90	Ethyl tetradecanoate	2027	1780	A,B		4	15	2
91	Ethyl octadecanoate	2047	1506	A,B		1	3	1
93	$\gamma$ -Decalactone	2101	1418	B	[1,3,6,7]	596	1123	17
94	$\delta$ -Decalactone	2144	1442	B	[1,3,6,7]	40	96	4
96	$\gamma$ -Undecalactone	2210	1523	B	[1,3,6]	91	193	6
97	$\gamma$ -Dodecalactone	2317	1630	B	[3,6,7]	7	27	1

[1] Polesello et al. (1989); [2] Guichard et al. (1990); [3] Narain et al. (1990); [4] Chung et al. (1993); [5] Nishimura (1995); [6] Visai and Vanoli (1997); [7] Derail et al. (1999).

<sup>a</sup> Kovats Index.

<sup>b</sup> Carbowax phase.

<sup>c</sup> Silicone phase.

<sup>d</sup> Identification (A, retention time, B, mass spectrometry).

<sup>e</sup> References.

<sup>f</sup> (Peak area/IS area)  $\times$  1000.

<sup>g</sup> Number of samples where the compound was found.

<sup>h</sup> Tentatively identified.

Table 5  
Volatile compounds of pear juice

		KI <sup>a</sup> Cw <sup>b</sup> phase	KI SPB-1 <sup>c</sup> phase	Id. <sup>d</sup>	Ref. <sup>e</sup>	Mean <sup>f</sup>	Standard deviation <sup>f</sup>	No. samples <sup>g</sup>
1	Limonene	1206	1017	A,B	[2]	330	684	6
2	Ethyl hexanoate	1223	982	A,B	[3,4]	3	11	1
5	Hexyl acetate	1268	997	A,B	[1,3,4]	2965	5747	11
9	3-Hexenyl acetate	1300	988	A,B	[3]	4	14	1
10	2-Hexenyl acetate <sup>h</sup>	1315	997	B		43	99	2
11	1-Hexanol	1316	858	A,B	[1–4]	67	88	9
13	Unknown peak 1	1339	1000			137	477	3
15	Heptyl acetate	1361	1095	B	[3,4]	131	425	2
16	Methyl octanoate	1378	1107	B	[3,4]	5	15	2
17	Hexyl butyrate	1398	1174	B	[3,4]	18	47	4
18	Hexyl isobutyrate <sup>h</sup>	1418	1175	B		663	2066	5
20	Octyl acetate	1424	1193	A,B	[3,4]	176	587	4
23	Ethyl octanoate	1428	1180	A,B	[3,4]	286	594	9
26	Acetic acid	1465	1137	A,B	[2,4]	38	70	6
28	2-Furancarboxyaldehyde	1467	815	B		5	10	3
33	Ethyl 4-octenoate <sup>h</sup>	1505	1075	B		67	193	3
37	Linalool	1537	1083	A,B	[2]	9	16	4
40	<i>n</i> -Octanol	1546	1061	A,B	[1,3,4]	3	9	3
41	Ethyl 2-octenoate	1557	1275	B	[3]	2	9	1
43	Methyl decanoate	1581	1307	A,B	[3,4]	1	3	1
44	Hexyl hexanoate	1599	1268	B	[3,4]	137	402	6
47	Methyl 4-decenoate	1611	1171	B	[3,4]	27	55	5
48	Ethyl decanoate	1624	1378	A,B	[3,4]	52	66	9
50	3-Hexenyl hexanoate <sup>h</sup>	1646	1361	B		27	91	3
52	Ethyl 4-decenoate	1657	1375	B	[1,3]	113	194	7
54	$\alpha$ ( <i>Z</i> , <i>E</i> )-Farnesene	1692	1478	B	[3,4]	282	529	7
55	Methyl 2-decenoate	1694	1411	B	[3,4]	8	8	6
59	$\alpha$ ( <i>E</i> , <i>E</i> )-Farnesene	1740	1492	B	[2–4]	2254	3248	10
60	Geranyl acetate <sup>h</sup>	1745	1254	B		8	19	2
61	Ethyl 2-decenoate	1750	1166	B	[3]	27	62	2
63	Methyl 2,4 ( <i>Z</i> , <i>E</i> )-decadienoate	1768	1332	B	[1,3]	555	808	6
64	Methyl 2,4 ( <i>E</i> , <i>Z</i> )-decadienoate	1785	1369	B	[1,3,4]	333	637	8
68	$\beta$ -Damascenone <sup>h</sup>	1806	1354	B		29	43	6
70	Anethole	1819	1254	B	[1]	33	50	6
71	Unknown peak 2	1820	1222			136	364	6
72	Ethyl 2,4 ( <i>E</i> , <i>Z</i> )-decadienoate	1832	1443	B	[1,3,4]	2827	2668	11
74	Unknown peak 3	1836	1424			26	38	5
75	Ethyl dodecanoate	1844	1582	A,B		34	60	6
77	Geranyl isobutyrate <sup>h</sup>	1860	1325	B		30	53	3

Table 5 (continued)

		KI <sup>a</sup> Cw <sup>b</sup> phase	KI SPB-1 <sup>c</sup> phase	Id. <sup>d</sup>	Ref. <sup>e</sup>	Mean <sup>f</sup>	Standard deviation <sup>f</sup>	No. samples <sup>g</sup>
79	Unknown peak 4	1869	1398			26	54	5
80	Ethyl 3-hydroxy dodecanoate <sup>h</sup>	1886	1574	B		95	210	4
84	Geranyl butirate <sup>h</sup>	1964	1535	B		240	600	3
85	Ethyl 2,4 ( <i>E,E</i> )-decadienoate	1986	1414	B	[3]	107	158	8
87	Nerolidol	1991	1553	B	[2]	17	28	4
88	Cinnamaldehyde <sup>h</sup>	1996	1506	B		26	22	9
89	Ethyl 2,6 ( <i>Z,E</i> )-dodecadienoate <sup>h</sup>	2000	1717	B		1	3	1
90	Ethyl tetradecanoate	2027	1780	A,B	[3]	16	52	1
92	Amyl benzoate <sup>h</sup>	2055	1506	B		10	15	5
95	Methyl tetradecadienoate	2174	1707	A,B	[3]	10	14	6

[1] Polesello et al. (1989); [2] Chung et al. (1993); [3] Suwanagul and Richardson (1998a); [6] Chervin, Speirs, Loveys, and Patterson (2000).

<sup>a</sup> Kovats Index.

<sup>b</sup> Carbowax phase.

<sup>c</sup> Silicone phase.

<sup>d</sup> Identification (A, retention time, B, mass spectrometry).

<sup>e</sup> References.

<sup>f</sup> (Peak area/IS area) × 1000.

<sup>g</sup> Number of samples where the compound was found.

<sup>h</sup> Tentatively identified.

sample formulation (Table 1) may also explain the variability of the volatile compounds determined in the fruit juice samples of the same kind (apricot, peach and pear).

Apricot aroma was composed of esters (ethyl, acetate and hexyl esters), some terpenoids, and naphthalene-like compounds (Fig. 1 and Table 3). Alcohol and aldehydes of six carbon atoms, responsible for the herbaceous odour of several fruits (Gomez & Ledbetter, 1997; López-Tamames et al., 1997), were poorly detected in the current study. This finding could be due to their low factor responses (see 1-hexanol in Table 2), although these compounds were highly volatile and plentiful. However, eleven substances were detected in all the apricot samples and some of them, were tentatively identified for the first time in apricot juices ( $\alpha$ -terpinolene, hexyl isovalerate,  $\alpha$ -farnesene, and cinnamaldehyde).

Commercial peach juices contained compounds such as esters and lactones (Fig. 2 and Table 4), although only  $\gamma$ -decalactone was present in all the peach juices. In other studies, which used distinct analytical methods (Dynamic Headspace, Vacuum Distillation, Solid Phase Extraction and Steam Distillation), lactones were the main compounds responsible for peach fruit flavour aroma (Derail et al., 1999; Horvat & Chapman, 1990; Narain et al., 1990; Polesello et al., 1989; Visai & Vanoli, 1997). We also detected several terpenoids and norisoprenoids (Table 4), which could be explained by the high affinity of the PDMS fibre for these compounds (Steffen & Pawliszyn, 1996). Although we analysed commercial juices and taking into account that aroma were more diluted than those of the raw material, we measured more compounds than most of other studies. Only Narain et al. (1990), determined 104 substances,

but many of them are herbaceous aldehydes and alcohols that were poorly detected on the current study. Several compounds as naphthalene derivatives were tentatively identified for the first time in peach products.

In commercial pear juices (Fig. 3 and Table 5), only hexyl acetate and ethyl 2,4 (*E,Z*)-decadienoate were present in all the pear samples. Some authors (Polesello et al., 1989; Suwanagul & Richardson, 1998a, 1998b) reported that methyl, ethyl and acetate esters are the main pear aroma compounds. Comparing our results with those of Chervin et al. (2000), which applies SPME to pear fruits, they detected some alcohols (phenylethanol and dodecanol) and aldehydes (2-hexenal, nonanal, and 2-octenal).

### 3.1. Discriminant characteristics of the aroma compounds by HS/SPME

The volatile contents of apricot, peach and pear juices are shown in Tables 3–5, respectively, by mean and standard deviation for the various samples of a given fruit juice. Fig. 4 showed the Discriminant Analysis with the most representative aroma compounds, pH and °Brix of apricot, peach, and pear juices. The separation between juices obtained from apricot, peach and pear was the 100% according to the classification made by cross validation. The discriminant Function 1 was defined for hexyl isovalerate (tentatively identified) and unknown peak KI 1505 while Function 2 was defined by pH, unknown peak KI 1836,  $\beta$ -ocimene, hexanol, hexyl hexanoate (tentatively identified), methyl 2-decenoate, methyl 2,4 (*E,Z*)-decadienoate, anethole and ethyl 2,4 (*E,Z*)-decadienoate.

Moreover, the discriminant analysis was then applied in order to discriminate the nectars according to its



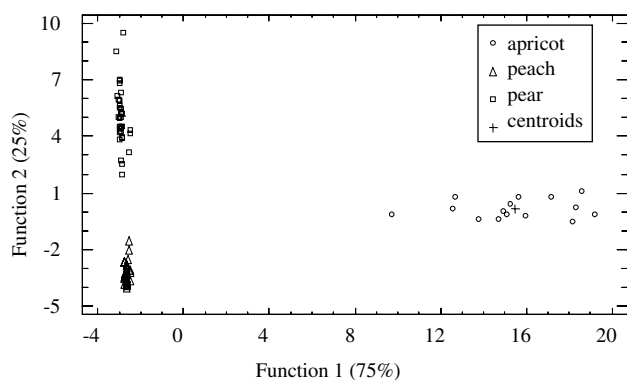


Fig. 4. Discriminant analysis of characteristic aroma of peach, apricot, and pear juices and nectars.

production, organic or conventional and also, taking into account the flavoured samples (Table 1) (data not shown). The 100% of the flavoured samples were correctly classified according to the classification made by cross validation. The 94% of the organic nectars were correctly classified and the 92% of the conventional ones. Only two samples of peach were wrong identified, one of them of organic production and the other, conventional. These preliminary results indicate that various groups of volatiles are potential markers of organic fruit juices, even if specific studies and more HS-SPME data were required to verify and confirm this possibility.

In conclusion, the HS-SPME method was applied satisfactorily to analyse the aroma profile of approximately 30 commercial fruit juices. Although this method has low response factors for herbaceous aldehydes and alcohols, it detects a wide profile of aroma compounds in commercial peach, apricot, and pear juice. This HS-SPME method offers to the fruit juice industry an alternative technique for routine analysis to rapidly control the quality of aroma. This method could provide data on fruit markers and the type of agriculture used (conventional or organic).

### Acknowledgements

This study was supported by the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) with project VIN01-051, the Ministerio de Educación y Cultura (MEC) (Spain) with HI1999-0121 project, the Generalitat de Catalunya (Autonomous Government), with the project 2001SGR00131. M. Riu-Aumatell, a PhD student, received a grant from the Universitat de Barcelona.

### References

Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.

- Botondi, R., DeSantis, D., Bellicontro, A., Vizovitis, K., & Mencarelli, F. (2003). Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1189–1200.
- Chervin, C., Speirs, J., Loveys, B., & Patterson, B. D. (2000). Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and crushed pear flesh. Short communication. *Postharvest biology and technology*, 19, 279–285.
- Chung, T. Y., Eiserich, J. P., & Shibamoto, T. (1993). Volatile compounds isolated from edible korean chanchwi (*Aster scaber* thunb). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1693–1697.
- Commission Regulation (EC) No. 223/2003 of 5 February 2003 on labelling requirements related to the organic production method for feedingstuffs, compound feedingstuffs and feed materials and amending Council Regulation (EEC) No. 2092/91.
- Council Regulation (EEC) No. 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring there to on agricultural products and foodstuffs.
- Council Directive No. 2001/112/EC of 20 December 2001 relating to fruit juices and certain similar products intended for human consumption.
- Deraïl, C., Hofmann, T., & Schieberle, P. (1999). Differences in key odorants of handmade juice of yellow-flesh peaches (*Prunus persica* L.) induced by the the workup procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4742–4745.
- Di Cesare, L. F., Nani, R., Mariani, N., & D'Angelo, V. (1996). Influenza delle maltodestrine, ciclodestrine e dell'olio di palma sulla ritenzione degli aromi nei disidratati di albicocca. *Industrie delle Bevande*, 25, 101–107.
- Douillard, C., & Guichard, E. (1990). The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): Characterization of some cultivars and influence of freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 517–531.
- Gomez, E., & Ledbetter, C. A. (1997). Development of volatile compounds during fruit maturation: Characterization of apricot and plum × apricot hybrids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 541–546.
- Guichard, E. (1988). Quantification of some volatile aromatic compounds of apricot by adding standards. A research note. *Journal of Food Science*, 53(6), 1902–1904.
- Guichard, E., Schlich, P., & Issanchou, S. (1990). Composition of apricot aroma: Correlations between sensory and instrumental data. *Journal of Food Science*, 55(3), 735–738.
- Horvat, R. J., & Chapman, G. W. (1990). Comparison of volatile compounds from peach fruit and leaves (cv. Monroe) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1442–1444.
- Ibañez, E., López-Sebastián, S., Ramos, E., Tabera, J., & Reglero, G. (1998). Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 63(2), 281–286.
- Jia, M., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (1998). Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2744–2747.
- Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., & Bouvier, J. M. (1999). Changes in aromatic volatile composition of strawberry after high pressure treatment. *Food Chemistry*, 67, 7–16.
- Lin, J., Rouseff, R. L., Barros, S., & Naim, M. (2002). Aroma composition changes in early season grapefruit juice produced from thermal concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 813–819.
- López-Tamames, E., Carro-Mariño, N., Ziya Gunata, Y., Sapis, C., Baumes, R., & Bayonove, C. (1997). Potential aroma in several varieties of Spanish grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1729–1735.

- Matich, A. J., Rowan, D. D., & Banks, N. H. (1996). Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles. *Analytical Chemistry*, *68*, 4114–4118.
- Mawele Shamaila, M., Powrie, W. D., & Skura, B. J. (1992). Analysis of volatile compounds from strawberry fruit stored under modified atmosphere packaging (MAP). *Journal of Food Science*, *57*(5), 1173–1176.
- Narain, N., Hsieh, T. C.-Y., & Johnson, C. E. (1990). Dynamic headspace concentration and gas chromatography of volatile flavor components in peach. *Journal of Food Science*, *55*(5), 1303–1307.
- Nishimura, O. (1995). Identification of the characteristic odorants in fresh rhizomes of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using aroma extract dilution analysis and modified multidimensional gas chromatography–mass spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*, 2941–2945.
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, *38*, 270–278.
- Polesello, A., Di Cesare, L. F., & Nani, R. (1989). Recupero degli aromi dagli ortofrutticoli mediante estrazione in fase solida. *Industria delle Bevande*, *18*, 93–101.
- Rizzolo, A., Polesello, A., & Polesello, S. (1992). Use of headspace capillary GC to study the development of volatile compounds in fresh fruits. *Journal of High Resolution Chromatography*, *15*, 472–477.
- Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Begliomini, A. L., & Montedoro, G. (2000). Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: Optimization of the blanching parameters. *Food Chemistry*, *71*, 407–415.
- Song, J., Gardner, B. D., Holland, J. F., & Beaudry, R. M. (1997). Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 1801–1807.
- Song, J., Fan, L., & Beaudry, R. M. (1998). Application of solid phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 3721–3726.
- Steffen, A., & Pawliszyn, J. (1996). Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 2187–2193.
- Suwanagul, A., & Richardson, D. G. (1998a). Pear fruit volatiles characterized by SPME and capillary GLC/mass spectroscopy. *Acta Horticulturae*, *475*, 599–603.
- Suwanagul, A., & Richardson, D. G. (1998b). Identification of headspace volatile compounds from different pear (*Pyrus communis* L.) varieties. *Acta Horticulturae*, *475*, 605–623.
- Validation of compendial methods (1225) (1989). *The United States Pharmacopeia* (U.S.P. XII ed, pp.1710–1712). Easton: Mack Printing.
- Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia punicifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, *71*, 195–198.
- Visai, C., & Vanoli, M. (1997). Volatile compound production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Scientia Horticulturae*, *70*, 15–24.
- Zhang, Z., & Pawliszyn, J. (1993). Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, *65*, 1843–1852.

#### 4.1.2 Desarrollo de los compuestos volátiles del cava (vino espumoso) durante largo tiempo de envejecimiento en contacto con las levaduras

**Publicación:** M. Riu-Aumatell, J. Bosch-Fusté; E. López-Tamames, and S. Buxaderas. Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing in contact with lees. *Food Chem.*, 2005, 95, 237-242.

El objetivo del trabajo ha sido determinar, de la forma más rápida y precisa posible, compuestos marcadores de la evolución de los aromas postfermentativos del cava durante un largo envejecimiento (superior a 2 años) en contacto con las lías. Las dos muestras de cava estudiadas se han mantenido en crianza 27 meses y han sido elaboradas a escala industrial. Una de ellas está formada por un cupage de las variedades autóctonas Macabeo, Xarel·lo y Parellada y la otra es un cava rosado de la variedad Trepat. La extracción de los aromas se ha realizado mediante la microextracción en fase sólida de espacio de cabeza HS/SPME, utilizando dos fibras distintas: la más clásica, PDMS (empleada previamente para determinar los volátiles del cava y que actúa por absorción) y la más novedosa, DVB/CAR/PDMS (compuesta por tres fases y que combina las propiedades de la PDMS con fases más polares que actúan por adsorción).

Se han identificado y determinado 27 compuestos en el perfil característico del cava y las diferencias detectadas entre las dos fibras han sido únicamente cuantitativas. Los compuestos obtenidos pertenecen a distintas familias: mayoritariamente ésteres (de isoamilo, de etilo y acetatos), pero también alcoholes, ácidos y C<sub>13</sub>-norisoprenoides.

Con los datos conseguidos se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA) y se percibe que las muestras se agrupan según la fibra, de manera

que los norisoprenoides, los alcoholes y los ácidos parecen extraerse mejor con la fibra triple. El mecanismo mixto de adsorción de la fibra DVB/CAR/PDMS facilitaría la extracción de los aromas postfermentativos y de compuestos más polares (alcoholes y ácidos). Cuando el PCA se realiza con los resultados correspondientes a cada fibra por separado, la fibra PDMS no tiene la suficiente capacidad discriminante, mientras que la fibra triple señala, mediante el componente 1, los compuestos volátiles característicos de la variedad y, con el componente 2, separa las muestras en función del tiempo de envejecimiento. El análisis de regresión confirma las diferencias de volátiles en función del tiempo de crianza. Así pues, se obtienen más resultados significativos con la fibra triple que con la PDMS. Los acetatos disminuyen durante la crianza, mientras que el vitispirano, el 1,2-dimetil-1,1,6-trimetilnaftaleno (TDN) y el dietil succinato se incrementan en contacto con las lías. Destacar que el compuesto TDN sólo se encuentra en el cava de cupage de variedades blancas, lo que indicaría su origen varietal, probablemente en forma de precursor que se revela durante la crianza del vino.

Puede concluirse que, aunque ambas fibras detectan cualitativamente los mismos compuestos, las propiedades extractivas combinadas de la fibra triple DVB/CAR/PDMS usada en la técnica HS/SPME le conceden mayor capacidad discriminante, lo que permite distinguir los cavas en función de su tiempo de envejecimiento.

## Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees

M. Riu-Aumatell, J. Bosch-Fusté, E. López-Tamames, S. Buxaderas \*

*Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain*

Received 23 August 2004; received in revised form 16 November 2004; accepted 16 November 2004

### Abstract

In order to study the evolution of volatile compounds during long ageing times in contact with lees (more than 2 years), Headspace–solid phase microextraction (HS/SPME) method was applied to different cavas (Spanish Sparkling wine). Two different fiber coatings were used: PDMS which extracts the analytes by partitioning and DVB–CAR–PDMS which extracts either by partitioning or physically trapped the target compounds. Even though the volatile profile obtained by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) was similar, the triple phase seems to be more suitable to follow the development of the volatile profile during its ageing time. Hexyl, 2-phenylethyl and isoamyl acetates significantly decrease over time, while 1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene (TDN), vitispirane and diethyl succinate significantly increase during ageing in contact with lees.  
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Ageing; Cava; Headspace/solid-phase microextraction; Volatile compounds

### 1. Introduction

Cava is the Spanish sparkling wine (Certified Brand of Origin) produced by the traditional method which consists of a second fermentation in closed bottles and ageing in contact with lees for at least 9 months, the minimum time legally established (Council Regulation (EC), 1493/1999). Empirically, cava makers believe that long ageing time provides high quality cavas with a complex bouquet. This aroma is difficult to standardize due to the influence of biological processes, such as yeast autolysis (de la Presa-Owens, Schlich, Davies, & Noble, 1998; Escudero, Charpentier, & Etievant, 2000; Leroy, Charpentier, Duteurtre, Feuillat, & Charpentier, 1990; Loyaux & Adda, 1981; Pozo-Bayón, Polo, Martín-Álvarez, & Pueyo, 2004; Tominaga, Guimbertau, &

Dubordieu, 2003). The characterization of the development with to the ageing time of the bouquet of the high quality cavas could provide a great economy of time and money for the wine makers.

Very few studies exist on the volatile composition of cava according to the ageing time in contact with lees (Francioli, Guerra, López-Tamames, Guadayol, & Caixach, 1999; Francioli, Torrens, Riu-Aumatell, López-Tamames, & Buxaderas, 2003). These authors suggested that some volatile compounds, determined by the solid phase microextraction technique (SPME) using the polydimethylsiloxane (PDMS) fiber, characterized cavas with different ageing times. The PDMS fibers used previously for cava (Francioli et al., 1999, 2003) is a nonpolar fiber which extracts the target analytes by partitioning. Actually, different commercial bipolar fiber coatings exists. In these bipolar phase coatings, the volatile compounds could be extracted either by partitioning or they could be physically trapped (Shirey & Mindrup, 1999). Recently, in the study of Torrens,

\* Corresponding author. Tel.: +34 934024512; fax: +34 934035931.  
E-mail address: [susana@farmacia.far.ub.es](mailto:susana@farmacia.far.ub.es) (S. Buxaderas).

Riu-Aumatell, López-Tamames, and Buxaderas (2004), four fiber coatings were applied for white and red wine, and the divinylbenzene–carboxen–polydimethylsiloxane (DVB–CAR–PDMS) was shown to be the most appropriate to obtain the wider wine volatile profile.

In the current research, we studied the development of post-fermentative aroma and its evolution in cava during a long ageing time in contact with lees (more than 2 years). The evolution of the volatile profile of two cava series produced from different grape varieties after 9–27 months of ageing was performed by HS/SPME and GC/MS every three months. The extraction was performed with two fibers PDMS, as proposed Francioli et al. (2003), and the triple phase DVB–CAR–PDMS as recommended for Torrens et al. (2004) in wines to consider if the volatile profile obtained differs according to the fiber used.

## 2. Material and methods

### 2.1. Samples

Two series of cava (Spanish sparkling wine), with ageing time of 9, 12, 15, 18, 21, 24, and 27 months, were made by the same winery at industrial scale, from the autochthonous *Vitis vinifera* of the cava region. One series was a blend of the traditional white varieties to produce cava: Macabeu, Xarel·lo and Parellada (1:1:1). The other series was a *rosé* cava of the red variety, Trepát.

### 2.2. Reagents

An internal standard solution (IS) of nonanoic acid ethyl ester, 95% purity (Sigma, St. Louis, MO, USA) in methanol (SDS, Peypin, France) was prepared at a concentration of 1 g/l.

### 2.3. SPME fiber coatings

The SPME fibers tested were 100  $\mu$ m polydimethylsiloxane layer (PDMS) recommended for volatiles and 10 mm fiber coated with 50/30  $\mu$ m divinylbenzene–carboxen–polydimethylsiloxane layer (DVB–CAR–PDMS) recommended for flavours (volatiles and semivolatiles) in the catalog recommendations of Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

### 2.4. SPME conditions

SPME was performed at 35 °C in the headspace mode (with a distance from the liquid surface of 20 mm) in closed 10 ml vials (Reference 27385, Supelco, Bellefonte, PA, USA) containing 5 ml of sample and 5  $\mu$ l of IS for 30 min with magnetic stirring (700g). The fiber was activated prior to use each day by inserting it

into the GC injector at 250 °C for 30 min. The desorption time was 5 min. For each cava sample HS–SPME was applied in triplicate.

### 2.5. GC–MS analysis

The separation was carried out by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5971A mass spectrometer coupled to a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) 5890A Series II chromatograph. A Supelcowax 10 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) capillary column with polyethylenglycol 20 M stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) and SPB-1™ capillary column with fused silica stationary phase (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) were used. The chromatographic conditions used were the same as that of Francioli et al. (2003). Electron impact mass spectra were recorded at a voltage of 70 eV ionization energy in the 15–250 u mass range, and 2 scans/s.

### 2.6. Qualitative analysis

Fig. 1 showed the chromatograms of 9 and 27 months of ageing time obtained with PDMS (a and c) and DVB–CAR–PDMS (b and d), respectively. The number of compounds corresponds to the compounds listed in Table 1. Volatile compounds were identified by comparing them with a private spectra library created with chemical standards and two spectral libraries (NIST/EPA/MSDC 49K Mass Spectral Database, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA and Registry of Mass Spectral Data with Structures, Wiley 6.1, NY, USA), as well as with relative retention times when chemical standards were available. We also used the retention index standards (Sigma, St Louis, MO, USA) of C8 and C32 aliphatic hydrocarbons dissolved in methanol to calculate the Kováts index (KI) in CW and SPB-1 columns, respectively (Table 1).

### 2.7. Quantitative analysis

Quantification was done by the internal standard method and the volatile compounds identified were quantified by considering the relative response factor to be 1 and were expressed as mg/l equivalents of IS. The RSD values, calculated from the triplicates of each cava sample, were similar for both fibers used (data not shown).

### 2.8. Statistical procedures

Principal components analysis (PCA) was applied in order to find either varietal, ageing time or fiber coating groupings. The relationship between ageing time (months) and the levels of aroma compounds was made by simple regression analysis and one-way ANOVA

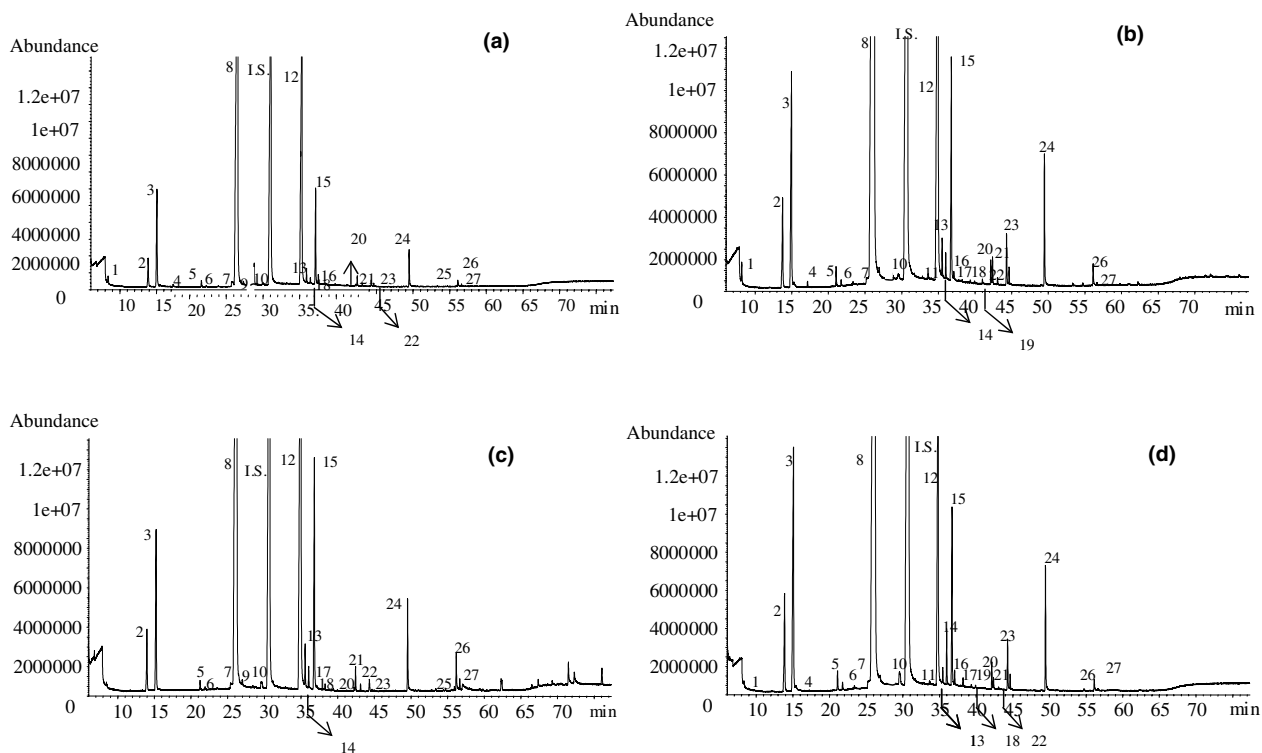


Fig. 1. Chromatograms of sparkling wines by HS/SPME method: (a) chromatogram of a sparkling wine obtained with PDMS fiber of 9 months of ageing time; (b) chromatogram of a sparkling wine obtained by DVB-CAR-PDMS fiber of 9 months of ageing time; (c) chromatogram of a sparkling wine obtained with PDMS fiber of 27 months of ageing time; (d) chromatogram of a sparkling wine obtained by DVB-CAR-PDMS fiber of 27 months of ageing time. Peak numbers correspond to the compounds listed in Table 1.

analysis. Significant result was considered when  $p < 0.05$  (Statgraphics Plus 4.1).

### 3. Results and discussion

Twenty seven compounds were detected in the characteristic volatile profile of cavas (Fig. 1). The differences observed according to the fiber used (Fig. 1(a) and (c) with Fig. 1(b) and (d)) or the ageing time (Fig. 1(a) and (b) with Fig. 1(c) and (d)) were mainly quantitative. The numbered peak 11 (unknown peak 1,  $m/z$  59, 72, 88, 101) was only detected with the triple phase fiber while the isoamyl hexanoate was only detected with the PDMS phase (Table 1). The tentatively identified volatile compounds vitispirane, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene (TDN) ethyl 2-methyl octanoate and ethyl decanoate (Table 1 and Fig. 1) were previously cited by Francioli et al. (1999) in sparkling wines. These compounds and ethyl hexadecenoate were detected with both fibers.

In order to obtain the groupings of the cavas according to the volatile compounds determined by HS/SPME, principal components analysis (PCA) was carried out (Fig. 2). Two groups were obtained according to the fiber used [Component 1 (34%)]. The analysis of variance

(one-way ANOVA) shows significant differences between these two groups (data not shown). Ethyl esters of high molecular weight (ethyl 2-methyloctanoate, dodecanoate, hexadecanoate and hexadecenoate) and isoamyl hexanoate were significantly higher in the samples determined by PDMS fiber while ethyl esters of low molecular weight (ethyl hexanoate, octanoate and lactate), alcohols (hexanol and 2-phenylethanol), fatty acids (hexanoic and octanoic acid) and post-fermentative aromas (vitispirane and diethyl succinate) were higher in cavas determined by DVB-CAR-PDMS. The two action mechanism of the triple phase fiber may have favoured the extraction of more polar compounds such as alcohols and acids.

When the principal components analysis (PCA) was performed with both fibers separately, any significant grouping according to the ageing time was obtained with the PDMS fiber (data not shown). Probably the combination of both mechanisms (absorbent and adsorbent) in the triple phase fiber enhanced its discriminant capacity. The PCA of the volatile compounds obtained with DVB-CAR-PDMS fiber is shown in Fig. 3. Although the volatile composition was different in white or rosé sparkling wine [Component 1 (32%)], the samples were distributed on the plane according to their ageing time [Component 2 (20%)]. Samples between 9 and

Table 1

Compounds determined by the HS/SPME method, Kováts index, identification and minimum and maximum values for the fibers PDMS and DVB–CAR–PDMS

	KI <sup>a</sup> Cw <sup>b</sup> phase	KI SPB- 1 <sup>c</sup> phase	Id. <sup>d</sup>	PDMS		DVB–CAR–PDMS		
				Minimum <sup>e</sup>	Maximum <sup>e</sup>	Minimum	Maximum	
1	Isoamyl acetate	1116	860	A, B	n.d. <sup>f</sup>	2.799	n.d.	5.877
2	Isoamyl alcohol	1211	719	A, B	0.048	1.612	0.023	0.855
3	Ethyl hexanoate	1230	984	A, B	0.594	2.242	0.047	2.655
4	Hexyl acetate	1267	1012	A, B	n.d.	0.684	0.003	0.033
5	Ethyl lactate	1334	1135	A, B	0.021	0.165	0.023	0.152
6	Hexanol	1347	858	A, B	n.d.	0.066	0.022	0.059
7	Ethyl 2-methyloctanoate	1415	1224	B <sup>g</sup>	n.d.	0.245	n.d.	0.120
8	Ethyl octanoate	1436	1184	A, B	1.427	26.652	8.600	22.972
9	Isoamyl hexanoate	1451	1233	A, B	n.d.	0.203	n.d.	n.d.
10	Vitispirane	1507	1260	B <sup>g</sup>	n.d.	0.126	0.020	0.223
11	Unknown peak 1 ( <i>m/z</i> 59, 72, 88, 101)	1603	1147		n.d.	n.d.	0.015	0.099
12	Ethyl decanoate	1634	1381	A, B	3.314	9.990	3.043	8.630
13	Isoamyl octanoate	1649	1429	A, B	0.061	0.397	0.083	0.344
14	Diethyl succinate	1662	1153	A, B	0.004	0.205	0.089	0.460
15	Ethyl decenoate	1681	1437	B <sup>g</sup>	n.d.	2.241	0.729	10.449
16	Unknown peak 2 ( <i>m/z</i> 57, 97, 151, 180)	1689	1247		n.d.	1.086	0.010	0.125
17	1,2-Dimethyl-1,1,6-trimethylnaphthalene	1719	1474	B <sup>g</sup>	n.d.	0.063	n.d.	0.068
18	Unknown peak 3 ( <i>m/z</i> 55, 70, 83, 97)	1750	1263		n.d.	0.035	0.007	0.041
19	2-Phenylethyl acetate	1795	1222	A, B	n.d.	0.048	n.d.	0.080
20	Hexanoic acid	1826	1579	A, B	n.d.	0.162	0.047	0.204
21	Ethyl dodecanoate	1833	1577	A, B	0.021	0.606	0.042	0.135
22	Isoamyl decanoate	1853	1633	A, B	n.d.	0.076	0.002	0.081
23	2-Phenylethanol	1888	1080	A, B	n.d.	0.385	0.157	1.202
24	Octanoic acid	2038	1356	A, B	n.d.	0.691	0.250	1.639
25	Ethyl hexadecanoate	2229	1978	A, B	n.d.	0.199	n.d.	0.026
26	Decanoic acid	2254	1363	A, B	0.016	0.619	0.005	1.527
27	Ethyl hexadecenoate	2269	1438	B <sup>g</sup>	n.d.	0.207	n.d.	0.018

<sup>a</sup> Kováts index.

<sup>b</sup> Carbowax phase.

<sup>c</sup> Silicone phase.

<sup>d</sup> Identification (A, retention time; B, mass spectrometry).

<sup>e</sup> mg/l equivalents of ethyl nonanoate (IS).

<sup>f</sup> Not detected.

<sup>g</sup> Tentatively identified.

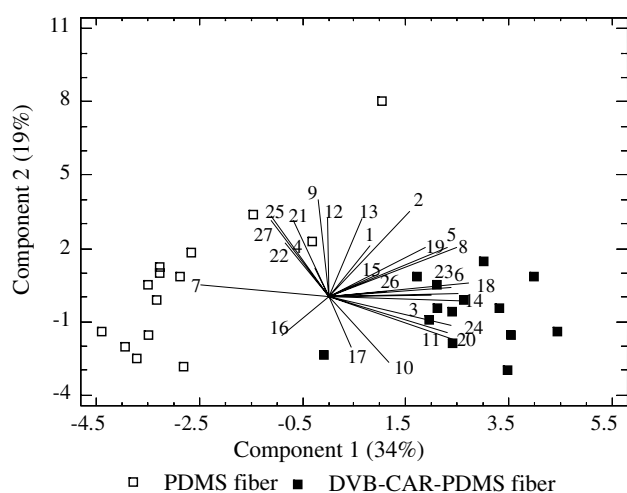


Fig. 2. Principal components analysis of the mean of the triplicates of the volatile compounds of cavas determined by PDMS and DVB–CAR–PDMS fibers. The vector numbers correspond to that of Table 1.

15 months were in the lower zone of the plane while the samples of 21 to 27 months were in the upper zone. Some acetate, ethyl and isoamyl esters of high molecular weight, seem to be typical aromas of cavas of low ageing time, while vitispirane, diethyl succinate, TDN, hexanol (related to autolysis process according to Francioli et al., 2003) and ethyl lactate seem to be compounds inherent in the bouquet of long aged cavas ( $p < 0.05$ ) (Francioli et al., 1999; Francioli et al., 2003). Similar results were obtained by Loyaux and Adda (1981) during Champagne ageing, which showed a decrease in hexyl acetate and an increase in the concentration of vitispirane. Some authors suggest that it is the yeast autolysis, that occurs after approximately 18 months in contact with lees, which causes changes in aroma composition due to the enzymatic release from glycosidic precursors. Carotenoids are the origin molecules of C<sub>13</sub> norisoprenoids. These compounds are substances that could originate from the direct degradation of carotenoid molecules



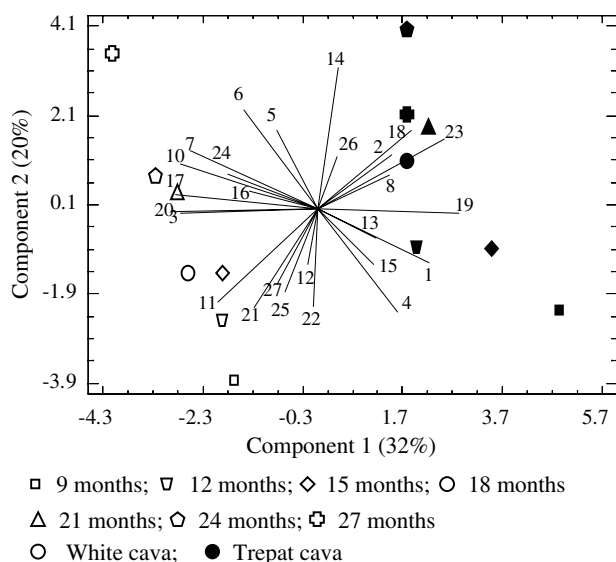


Fig. 3. Principal component analysis of the mean of the triplicates of the volatile compounds determined by DVB-CAR-PDMS fiber. The vector numbers correspond to that of Table 1.

and also from the hydrolysis of glycoside molecules. Vitispirane has a megastigme precursor and is linked to a sugar molecule. TDN is released during bottle storage and its origin is not clear. While some authors have shown that TDN is a direct degradation product of carotene (Rapp, 1998), others have shown two possible precursors in grape linked to a sugar molecule (Winterhalter, 1991; Silva Ferreira & Guedes de Pinho, 2004).

These changes of volatile composition according to ageing time, were confirmed by simple regression analysis. Table 2 shows the coefficients of regression ( $r$ ) and the significant levels ( $p$ ) obtained between the aroma

compounds and the ageing time (months) according to the fiber used and the cava type (white and rosé). Even though most of the regression models were linear ( $y = a + bx$ ), some of them follow a reciprocal model ( $y = a + b/x$ ). This last model was followed for some compounds determined with triple phase fibers notably ethyl hexadecanoate in white cava and isoamyl acetate and ethyl decanoate in Trepata cava. More significant results were obtained with triple phase than PDMS fiber. The evolution of acetate esters decreased with the ageing time (Fig. 3) while vitispirane, TDN, and diethyl succinate increased with time in contact with lees (Fig. 3). It was noticeable that TDN only was found in white cava. Probably the precursor of TDN had a varietal origin. Our results could confirm the presence of TDN precursor according to the varietal base wine. This precursor could be an early norisoprenoid as 3,6-dihydroxy-7,8-dihydro- $\alpha$ -ionone, 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- $\beta$ -ionone and 3,9-dihydroxyteaspirane (Winterhalter, 1993), could be linked to a sugar molecule or TDN could be a compound resulting from carotene metabolism by yeast.

In conclusion, some volatiles showed a significant behaviour in relation to ageing in contact with lees (more than 2 years). Acetate esters were higher in young cavas while TDN, vitispirane and diethyl succinate increased in long aged samples. Despite the qualitative volatile profile obtained being similar with both fibers, DVB-CAR-PDMS fiber could be more suitable than PDMS to follow the volatile kinetics of cava bouquet. A lot of questions still exist according to the origin of post-fermentative aromas in bottle ageing in contact with lees. The origin of aromatic compounds in aged cavas (Spanish sparkling wine) is currently under investigation.

Table 2  
Significant results of regression analysis between the ageing time (months) and aroma compounds for fiber type and cava type

	PDMS				DVB-CAR-PDMS			
	White cava ( $n = 7$ )		Trepata cava ( $n = 7$ )		White cava ( $n = 7$ )		Trepata ( $n = 7$ )	
	$r$	$p$	$r$	$p$	$r$	$p$	$r$	$p$
Isoamyl acetate	-0.858	<0.05	-0.754	<0.05	-0.773	<0.05	-0.864 <sup>c</sup>	<0.05
Hexyl acetate	-0.872	<0.01	-0.417	<0.05	-0.881	<0.01	-0.945	<0.005
Ethyl lactate	n.s. <sup>a</sup>		n.s.		n.s.		0.830	<0.05
Hexanol	n.s.		n.s.		0.880	<0.01	0.473	<0.05
Vitispirane	0.824	<0.05	0.900	<0.005	0.990	<0.001	0.730	<0.1
Unknown peak 1	n.d. <sup>b</sup>		n.d.		-0.831	<0.05	n.s.	
Diethyl succinate	0.848	<0.01	n.s.		0.940	<0.005	0.898	<0.01
Ethyl decanoate	n.s.		n.s.		n.s.		-0.776 <sup>c</sup>	<0.05
1,2-Dimethyl-1,1,6-trimethylnaphthalene	0.899	<0.005	n.d.		0.971	<0.001	n.d.	
2-Phenylethyl acetate	n.d.		-0.625	<0.01	-0.807	<0.05	n.s.	
Ethyl dodecanoate	n.s.		n.s.		-0.917	<0.005	-0.443	<0.05
Ethyl hexadecanoate	n.s.		n.s.		0.888 <sup>c</sup>	<0.01	n.d.	

<sup>a</sup> Not significant.

<sup>b</sup> Not detected.

<sup>c</sup> Reciprocal-X model.

## Acknowledgements

We are grateful to Segura Viudes SA, Castellblanch SA and Freixenet SA wineries for providing samples. This study was made possible thanks to financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain) VIN01-051, from Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2001SGR-00131 and through a Grant from the Generalitat de Catalunya to the PhD student J. Bosch-Fusté.

## References

- Council Regulation (EC) No. 1493/1999 of 17 May 1999 on the common organisation of the market in wine 1179/1-84.
- de la Presa-Owens, C., Schlich, P., Davies, H. D., & Noble, A. C. (1998). Effect of Méthode Champenoise process on aroma of four *V. Vinifera* varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, *49*(3), 289–294.
- Escudero, A., Charpentier, M., & Etievant, P. (2000). Characterization of aged champagne wine aroma by GC–O and descriptive profile analyses. *Science des Aliments*, *20*(3), 331–346.
- Francioli, S., Guerra, M., López-Tamames, E., Guadayol, J. M., & Caixach, J. (1999). Aroma of sparkling wines by headspace/solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*(4), 404–408.
- Francioli, S., Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2003). Volatile compounds by SPME–GC as age markers of sparkling wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *54*(3), 158–162.
- Leroy, M. J., Charpentier, M., Duteurtre, B., Feuillat, M., & Charpentier, C. (1990). Yeast autolysis during champagne aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, *41*(1), 21–28.
- Loyaux, D., & Adda, J. (1981). The evolution of champagne volatiles during aging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *32*, 1254–1258.
- Pozo-Bayón, M. A., Polo, M. C., Martín-Álvarez, P. J., & Pueyo, E. (2004). Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chemistry*, *86*, 413–419.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, *42*, 351–363.
- Shirey, R. E., & Mindrup, R. F. (1999). SPME-adsorption versus absorption: which fiber is best for your application? Supelco.
- Silva Ferreira, A. C., & Guedes de Pinho, P. (2004). Silva Guedes de Nor-isoprenoids profile during port wine ageing-influence of some technological parameters. *Analytica Chimica Acta*, *513*, 169–176.
- Statgraphics Plus 4.1. (1994–1999). Statistical Graphics Corp., Rockville, Maryland.
- Tominaga, T., Guimbertau, G., & Dubordieu, D. (2003). Role of certain volatile thiols in the bouquet of aged champagne wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1016–1020.
- Torrens, J., Riu-Aumatell, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2004). Volatile compounds of red and white wines by headspace-solid phase microextraction using different fibers. *Journal of Chromatographic Science*, *42*(6), 310–316.
- Winterhalter, P. (1991). 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) formation in wine. 1. Studies on the hydrolysis of 2,6,10,10-tetramethyl-1-oxaspiro[4.5]dec-6-ene-2,8-diol rationalizing the origin of TDN and related C<sub>13</sub> norisoprenoids in Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *39*, 1825–1829.
- Winterhalter, P. (1993). The generation of C-13 norisoprenoid volatils. In C. Bayonove, T. Crouzet, C. Flanzly, J. C. Martin, & J. C. Sapis (Eds.), *Connaissance aromatique des cépages at qualité des vins*. Rev. Fr. Oenol., Lattes, France (pp. 65–73).

#### 4.2 SEGUNDA PARTE: Efecto de los polisacáridos solubles sobre los volátiles

El objetivo de esta segunda parte de la tesis es estudiar la influencia de los enzimas pectolíticos en los compuestos volátiles, en la medida que se puedan ver afectados polisacáridos de la matriz. Por ello, la metodología pasa por poner a punto un método de cromatografía líquida de permeación sobre gel, GPC, que permita caracterizar la masa molecular de las cadenas polisacarídicas solubles de los zumos de frutas y detectar diferencias en los procesos de cultivo y en los de elaboración (apartado 3.2.1.1). Asimismo, los polisacáridos analizados por GPC han revelado su capacidad discriminante, al determinarse muestras de mosto de uva procedente de la misma variedad, pero con diferente índice de maduración y cultivada en viñas con distinta carga productiva (apartado 3.2.1.2).

Los tratamientos pectolíticos que se usan durante la elaboración de zumos, bien para aumentar el rendimiento de la extracción o bien como coadyuvantes de la clarificación, modifican la composición polisacarídica. La modificación cuali- y cuantitativa de las pectinas puede alterar el contenido de compuestos volátiles que resulten en el zumo elaborado, ya que las cadenas polisacarídicas actúan de soporte para muchos compuestos volátiles que participan en el aroma. Los resultados de esta parte de la memoria muestran el grado de influencia de los enzimas pectolíticos sobre el perfil de volátiles del zumo (apartado 3.2.2).

#### 4.2.1 Caracterización de los polisacáridos de zumos y néctares de fruta convencionales y biológicos

**Publicación:** M. Riu-Aumatell; M. Castellari; E. López-Tamames; S. Buxaderas. Caracterización de los polisacáridos de zumos y néctares de fruta convencionales y biológicos. Actas del II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (Martínez, D.; Castillo, S.; Valero, D.; Sayas, E.; Pérez Sánchez, J.A., eds.), Universidad Miguel Hernández, 2003, vol I, 171-174 (ISBN vol. I: 84-95893-75-4).

En este trabajo, presentado al II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, se ha estudiado la composición en polisacáridos de zumos y néctares comerciales de fruta. Se han analizado 17 muestras de melocotón, 11 de pera y 5 de albaricoque. De éstas, un 40% aproximadamente son de origen biológico.

El contenido total en polisacáridos se ha analizado por el método espectrofotométrico del fenol, mientras que la separación y cuantificación de las pectinas según su peso molecular se ha realizado mediante cromatografía de gel permeación (GPC), utilizando ácidos poliacrílicos como estándares de identificación de las masas moleculares.

Se han obtenido hasta 6 fracciones de polisacáridos para cada fruta. A pesar de ser muestras de muy distinto origen no se han determinado pesos moleculares significativamente dispares. Las diferencias entre frutas son debidas a la cantidad con que se encuentran cada una de las fracciones. Por esta razón, se cree que las diferencias cuantitativas pueden responder a que las variedades de fruta poseen distinta capacidad enzimática propia o bien, al uso de enzimas durante el proceso de elaboración. Cuando se realiza el análisis de componentes principales (PCA) con los resultados obtenidos, se observa una separación entre las muestras en función de si son de origen convencional, biológico o bien tienen pectina añadida. En general, las muestras de origen convencional se encuentran más cerca de los vectores de

polisacáridos de menor peso molecular, lo que puede indicar la utilización de enzimas pectolíticos en su transformación; mientras que los de origen biológico se encuentran cerca de los polisacáridos de mayor peso molecular, lo que señalaría un menor proceso tecnológico durante su elaboración. Estos resultados observados en la representación del PCA se confirman por análisis de la varianza, ya que sólo una de las fracciones intermedias (9000-18000 Da) no es significativamente diferente según las muestras.

Así pues, se pone de manifiesto la utilidad del método de elección, la cromatografía de gel permeación, GPC, para obtener perfiles de polisacáridos y la utilidad de éstos como marcadores de calidad en muestras de zumos de fruta, para discriminar entre muestras biológicas y convencionales.

## CARACTERIZACIÓN DE LOS POLISACÁRIDOS DE ZUMOS Y NÉCTARES DE FRUTA CONVENCIONALES Y BIOLÓGICOS

M. Riu-Aumatell<sup>a\*</sup>, M. Castellari<sup>b</sup>, E.López-Tamames<sup>a</sup>, S. Buxaderas<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA), Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Avda. Joan XXIII, s/n, 08028, Barcelona, España. E-mail: [susana@farmacia.far.ub.es](mailto:susana@farmacia.far.ub.es)

<sup>b</sup> IRTA-Unidad de Química Alimentaria, Granja Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Girona, España.

Palabras clave: pectinas, peso molecular, tratamiento tecnológico, cromatografía de gel permeación, calidad

### RESUMEN

En este estudio hemos investigado la composición polisacáridica de néctares y zumos de fruta comerciales procedentes de cultivo biológico y convencional. Se han determinado los polisacáridos totales y ácidos además de los contenidos y tipos de polisacáridos separados por peso molecular mediante cromatografía de gel permeación. Se ha utilizado el análisis de componentes principales y se ha observado como la composición en pectinas permite diferenciar muestras de origen biológico y convencional.

### INTRODUCCIÓN

Las pectinas forman parte de la pared celular vegetal y durante la maduración fisiológica del fruto y el posterior tratamiento tecnológico para obtener derivados de fruta, sufren una serie de cambios en su contenido y estructura. Básicamente están formadas por cadenas de ácidos urónicos esterificados en proporción variable con metanol. El peso molecular, el tipo de polisacárido, el grado de esterificación y las cadenas laterales son fundamentales para la textura de los productos vegetales (Sharma et al., 1998). El proceso de producción resulta un factor determinante para la cantidad y calidad de los coloides que pasarán al zumo o néctar de fruta (Will, et al., 1992).

Sin embargo, los polisacáridos, debido a su complejidad, son compuestos difíciles de determinar. Aunque las técnicas más recientes permiten obtener no sólo la concentración total, sino también información sobre el tipo de polisacárido (Schols et al., 1994).

El interés de los últimos tiempos por los temas alimentarios ha hecho que cada vez sea más habitual el consumo de productos de cultivo biológico y por tanto se haya incrementado también su producción. Actualmente no existen muchos estudios sobre estos alimentos (Asami, et al., 2003). El objetivo de este trabajo es la identificación y cuantificación de la composición polisacáridica de zumos y néctares comerciales de fruta por cromatografía de gel permeación. Además se aporta información sobre el perfil polisacáridico de muestras que provienen del cultivo biológico comparadas con muestras que proceden del cultivo convencional.

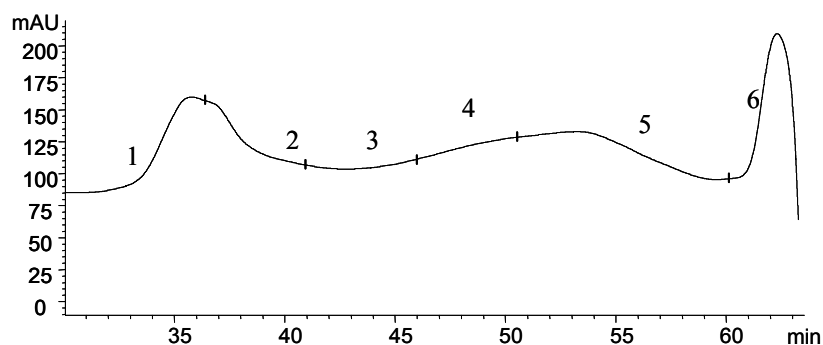
### MATERIAL Y MÉTODOS

#### *Muestras*

Se han estudiado zumos y néctares de fruta (pera, melocotón y albaricoque) de origen comercial. En total se han dispuesto de 17 muestras de melocotón, 11 muestras de pera y 5 de albaricoque. Del total de las muestras, un 40% provienen de la agricultura biológica.

### ***Técnicas analíticas***

Los polisacáridos totales y ácidos se han determinado mediante métodos espectrofotométricos con fenol 5% y o-difenil respectivamente, previo aislamiento con 5 volúmenes de etanol al 96% (Segarra et al., 1995). Los polisacáridos separados según su peso molecular se han obtenido siguiendo el método propuesto y validado por López-Barajas et al. (1998). Las pectinas son separadas según su peso molecular por cromatografía de gel permeación (GPC) usando ácidos poliacrílicos para obtener su correspondiente curva de calibración (entre 240.000 y 2.000 KDa). En la Figura 1 se muestra un cromatograma típico de un néctar de albaricoque donde se observan las 6 fracciones separadas por GPC.



**Figura 1:** Cromatograma obtenido de un néctar de albaricoque.

### ***Estadística***

Para realizar los análisis de componentes principales y ANOVA se ha utilizado el programa Statgraphics Plus 4.1. Las características del zumo o néctar (producción biológica, convencional o si tienen fibra añadida) se han utilizado como variables cualitativas.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se han podido identificar 6 fracciones de polisacáridos según su peso molecular (Tabla 1 y Figura 1). En la Tabla 1 se pueden observar los Intervalos de Confianza (IC) de los pesos moleculares y de las concentraciones (expresadas en g/L) para cada una de los tipos de muestra estudiados. El peso molecular de las diferentes fracciones de polisacáridos no varía significativamente entre las distintas frutas aunque las muestras tienen un origen muy distinto y, por el hecho de ser de origen comercial, probablemente hayan sufrido procesos tecnológicos distintos.

En la Figura 2 se observa el análisis de componentes principales en el cual los vectores corresponden a los distintos polisacáridos, así como a pH y Brix. Las muestras quedan separadas según su origen (convencional, biológico o bien tengan fibra añadida). Tanto el componente 1 como el 2 permiten observar diferencias entre convencionales y biológicos. Las muestras de producción biológica, se encuentran próximas a los vectores de los polisacáridos de mayor peso molecular (230.000-460.000 KDa y 43.000-115.000 KDa), mientras que las

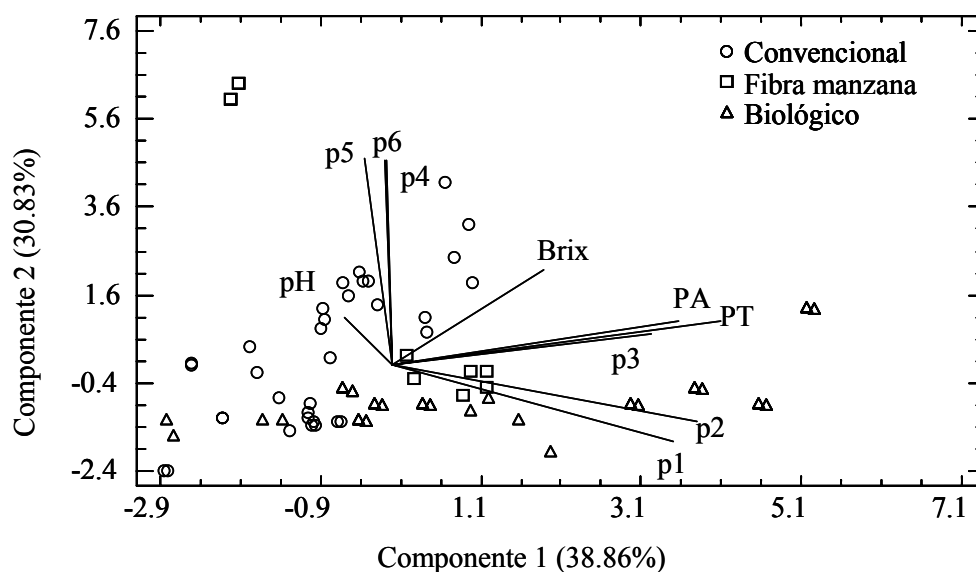
muestras convencionales están distribuidas cerca de los vectores de los polisacáridos de menor peso molecular (Tabla 1), probablemente porque en su proceso tecnológico se han usado enzimas pectolíticas con actividad hidrolítica (pectinmetilesterasa y poligalacturonasa) que rompan los polisacáridos dando pectinas de menor tamaño. Las muestras con fibra de manzana añadida se sitúan en el centro del gráfico excepto una que contenía fibra soluble añadida pero sin especificar en su etiquetado qué tipo de fibra. El resto de néctares con fibra añadida de manzana se encuentran más próximos a los de producción biológica que a los convencionales. Estas relaciones se confirman por análisis de ANOVA. El contenido en polisacáridos totales y ácidos es significativamente superior en las biológicas ( $p < 0.001$ ), así como en los polisacáridos de mayor peso molecular (230.000-460.000 KDa, 43.000-115.000 KDa;  $p < 0.001$ ). Mientras que los polisacáridos de menor peso molecular (1.200-3.500 KDa, 100-400 KDa y  $< 100$  KDa) son significativamente mayoritarios en las muestras de producción convencional ( $p < 0.01$ ). Sólo la fracción intermedia (9.000-18.000 KDa) no da resultados estadísticamente significativos entre zumos y néctares biológicos y convencionales.

En conclusión, el contenido polisacarídico podría ser útil como marcador de calidad de muestras derivadas de fruta para diferenciar muestras biológicas de las obtenidas de forma convencional, ya que la diferente fisiología de la fruta o bien las distintas prácticas de fabricación, condicionan el tipo de polisacárido encontrado.

**Tabla 1:** Intervalo de confianza de los polisacáridos por peso molecular y de la concentración según la fruta.

	Identificación-pM (KDa) IC (95%)	Contenido (g/L) IC (95%)
<b>Albaricoque</b> (n=5)	340.000 - 460.000	1.38 - 0.43
	43.000 - 115.000	1.61 - 0.41
	6.700 - 18.000	1.51 - 0.44
	500 - 3.500	0.63 - 0.17
	100 - 400	0.38 - 0.09
	0 - 100	0.29 - 0.05
<b>Melocotón</b> (n=17)	230.000 - 350.000	1.17 - 0.62
	40.000 - 68.000	1.08 - 0.53
	7.300 - 12.300	0.81 - 0.38
	800 - 2.000	0.51 - 0.18
	100 - 200	0.23 - 0.04
	0 - 100	0.14 - 0.03
<b>Pera</b> (n=11)	340.000 - 460.000	1.13 - 0.47
	44.000 - 66.000	0.83 - 0.45
	9.000 - 14.000	0.77 - 0.31
	1.200 - 2.000	0.25 - 0.11
	200 - 400	0.12 - 0.03
	0 - 100	0.07 - 0.02





**Figura 2:** Componentes Principales de los polisacáridos totales (PT), ácidos (PA), pH, Brix y las distintas fracciones por peso molecular (p1: 230.000-460.000 KDa, p2: 43.000-115.000 KDa, p3: 9.000-18.000 KDa, p4: 1.200-3.500 KDa, p5: 100-400 KDa, p6: <100 KDa).

## BIBLIOGRAFÍA

- Asami, D.K., Hong, Y.-J., Barrett, D.M., and Mitchell, A.E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1237-1241.
- Codex Standard for apricot, peach, and pear nectars preserved exclusively by physical means. Codex Stan 44-1981.
- Council Directive N° 2001/112/EC of 20 December 2001 relating to fruit juices and certain similar products intended for human consumption.
- López-Barajas, M., López-Tamames, E., and Buxaderas, S. (1998). Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *J. Chromatogr. A*, 823: 339-347.
- Segarra, I., Lao, C., López-Tamames, E., and de la Torre-Boronat, M.C. (1995). Spectrophotometric method for the analysis of polysaccharides levels in winemaking products. *Am.J.Enol.Vitic.*, 46: 564-570.
- Sharma, S.K., Liptay, A., and Le Maguer, M. (1998). Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. *Food Research International*, 30(7): 543-547.
- Schols, H.A., and Voragen, G.J. (1994). Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydrate Research*, 256: 83-95.
- Will, F., and Dietrich, H. (1992). Isolation, purification and characterization of neutral polysaccharides from extracted apple juices. *Carbohydrate polymers*, 18: 109-117.

#### 4.2.2 Influencia del rendimiento productivo y el índice de maduración sobre los polisacáridos y otros componentes del zumo de uva

**Publicación:** M. Riu-Aumatell; M. López-Barajas; E. López-Tamames; S. Buxaderas. Influence of yield and maturation index on polysaccharides and other compounds of grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (16), 4604-4607.

Se han estudiado 20 muestras de uva de la variedad Parellada utilizada para la elaboración del vino base en la producción de cava. Estas muestras, provenían de viñedos de distinta producción (kg/ha) y a la vez tenían distinto índice de maduración. Estos parámetros son dependientes del agricultor y muchas veces escapan del control de la bodega. No obstante, las bodegas conocen empíricamente que estos factores inciden en la calidad de la uva y, por lo tanto, del vino que se obtenga a partir de ésta. En principio se considera que una sobrecarga de uva en el viñedo puede retrasar la maduración por falta de insolación y por un reparto excesivo de los nutrientes, y así afectar a otras cualidades de la uva. Sin embargo, no hay datos científicos que avalen estas sospechas. El objetivo del trabajo fue estudiar la correlación entre la producción del viñedo y el índice de maduración y la composición péctica de la uva.

Se han determinado parámetros generales de control como pH, ° Brix, acidez total, ácidos orgánicos y azúcares, además de la composición coloidal: proteínas (método espectrofotométrico), polifenoles (absorbancia 280nm), polisacáridos totales (método espectrofotométrico) y polisacáridos según su peso molecular (por cromatografía de gel permeación).

Mediante análisis de componentes principales (PCA), se observa como las muestras se separan en función de la carga productiva de uva (<10500 kg y >10500 kg de uva por ha). No obstante, el análisis de la varianza no revela relación entre el

índice de maduración y el rendimiento productivo. A pesar que las uvas de menor producción en viña tienen menor acidez, no por ello son más maduras que el grupo de uvas recogidas de las viñas más explotadas. La composición en polisacáridos es menor en las muestras de mayor producción (kg/ha). Esto se podría explicar por un mayor reparto de nutrientes entre los frutos, lo que repercutiría en paredes celulares más delgadas y, por tanto, en un menor contenido en polisacáridos.

Cuando los dos grupos (<10500 kg y >10500 kg/ha) son estudiados por separado, el comportamiento es significativamente distinto, lo que revelaría que a elevadas producciones la fisiología de la planta es diferente o cambia el metabolismo. En las uvas procedentes de un mayor rendimiento productivo (>10500 kg uva/ha), el índice de maduración está positivamente correlacionado con algunas fracciones de polisacáridos (3000-2000, 62000-48000 Da), lo que podría indicar que los polisacáridos de menor peso molecular aumentan con la madurez de la uva, quizás por una mayor actividad enzimática endógena. En el grupo de menor producción (<10500 kg uva/ha), son tres las fracciones de polisacáridos (62000-48000, 28000-24000, y 3000-2000 Da) que están correlacionadas con el índice de maduración. Las fracciones de 62000-48000 y 3000-2000 Da son interesantes para los cavistas, ya que benefician la capacidad espumante de los vinos (López-Barajas, *et al.*, 2001). Por tanto, controlar el rendimiento de uva en la viña permite obtener mostos con la composición más adecuada para la elaboración de cava.

En conclusión, el método de cromatografía líquida de gel permeación ha permitido discriminar uvas de la misma variedad y vendimia, procedentes de viñedos con distinta carga productiva.

## Influence of Yield and Maturation Index on Polysaccharides and Other Compounds of Grape Juice

M. RIU-AUMATELL,<sup>†</sup> M. LÓPEZ-BARAJAS,<sup>‡</sup> E. LÓPEZ-TAMAMES,<sup>†</sup> AND  
S. BUXADERAS<sup>\*,†</sup>

Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA),  
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, Spain, and  
Escola de Ciències Experimentals i Tecnologia, Universitat Internacional de Catalunya,  
Nova Estació s/n, 43500 Tortosa, Tarragona, Spain

Wine producers may attempt to increase vine productivity, which usually decreases the quality. The quality of Cava (Spanish sparkling wine; Certified Brand of Origin in Spain) mainly depends on the composition of its colloids, which also determine foam quality. The yield (kg of grape/ha) and maturation index (ratio between soluble solids and titratable acidity) are two external factors that may alter grape characteristics, especially its composition. Twenty white grapes of the same variety (Parellada), but different yields (between 6000 and 17 000 kg/ha) were studied. By PCA, two grape groups were separated according to yield (<10 500 and >10 500 kg/ha). Yield and maturation index were not significantly correlated. Grapes obtained with yield >10 500 kg/ha had significantly higher content of soluble proteins and lower content of total polysaccharides and some polysaccharides fractions ( $M_r$  62 000–48 000,  $M_r$  28 000–24 000, and  $M_r$  7000–5000) than the grapes of the low-yield group (<10 500 kg/ha). Thus, it may be interesting to monitor yield, below 10 500 kg/ha, in vines used to produce Cava.

**KEYWORDS:** Maturation index; grape; polysaccharide; yield

### INTRODUCTION

Grape is the raw material of wine and Cava (Spanish sparkling wine; Certified Brand of Origin in Spain). The quality of grape is essential to the quality of the final product (foam capacity, flavor, and color). Grape quality depends on numerous factors such as climatic and soil conditions, cultural practices (pruning and rootstock), yield (kg of grape/ha), grade of ripening, variety, and sanitary conditions (1–5). Certain oenologists believe that excessive yields (kg of grape/ha) decrease quality. Some studies (2) show the effects of yield on grape composition, although the results disagree. Some authors do not find any association between yield and grape characteristics. Others relate high yields with a delay in maturation. The loss of quality of wines elaborated with high-yield grapes is due to a decrease in maturation. Moreover, we believe that yield can affect grape composition and thus its quality, because the Certified Brand of Origin (CBO) regulations establish a maximum yield based on kilograms of grape per hectare.

Grape composition affects the organoleptic characteristics of wine, including flavor (6, 7), color (8, 9), and foam capacity (10). The last property differentiates sparkling wines (such as Cava) from still wines. Several studies (10–17), denote the importance of polyphenols, polysaccharides, and soluble proteins

on foam behavior. López-Barajas et al. (15) show that the must quality determines the foam capacity of base wine, and they indicate also that the maturation index (between 4 and 5.5) of grape berries increases the wine foam capacity. The same authors (18) suggest that three wine polysaccharide fractions ( $M_r$  62 000–48 000, 13 000–11 000, and 3000–2000) enhance the foam properties.

The yield (kg of grape/ha) and maturation index (ratio between soluble solid content and titratable acidity) are independent of oenological practices, but they affect grape juice composition and vary according to climatic and cultural conditions, the ground, and the grape variety. We aimed to study the correlation between maturation index and yield and grape composition. The colloids that affect foam capacity, polysaccharides (total content and polysaccharides separated by molecular mass), soluble proteins, and polyphenols were examined. We used 20 white grapes of the same variety (Parellada), from several vineyards, cultivated in the Penedès region, each with a specific yield.

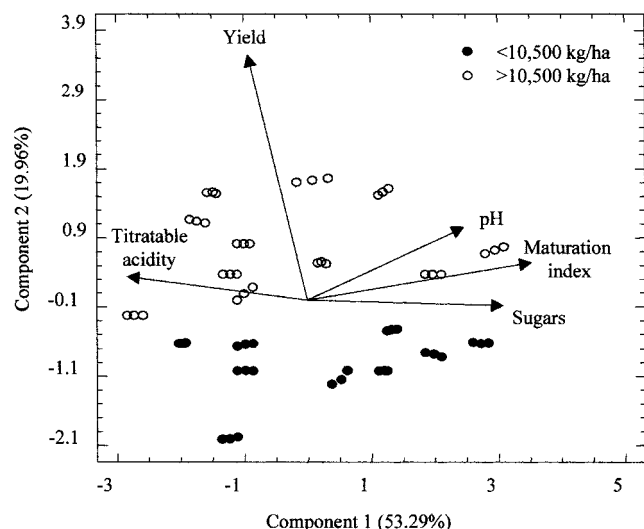
### MATERIALS AND METHODS

**Samples.** Twenty white grapes from different fields of the Penedès region, to produce Penedès wines or Cava (both Certified Brands of Origin in Spain), were hand-harvested. All samples were the same variety (Parellada) to avoid varietal variability. Samples with various levels of yields (between 6000 kg/ha and 17 000 kg/ha) were collected. Berry samples were crushed. Cloudy juices were filtered and then

\* To whom correspondence should be addressed. Phone: 34 3 4024512.  
Fax: 34 3 4035931. E-mail: susana@farmacia.far.ub.es.

<sup>†</sup> Universitat de Barcelona.

<sup>‡</sup> Universitat Internacional de Catalunya.



**Figure 1.** Principal component analysis applied to the main parameters determined.

centrifuged (2500g for 20 min at 10 °C). Clear juice volume was measured to calculate the juice output expressed as mL of grape juice/100 g of grape. The use output values were calculated to show the composition results in kg of grape, and also to establish the relationships between all the compounds with yield (kg of grape/ha). Samples were picked when they were at industrial maturity.

**Analytical Methods.** Oenological parameters of pH, soluble solid content, sugar content (g sugar/kg grape; obtained from °Brix, applying the OIV tables (19)), and titratable acidity (g tartaric acid/kg grape) were measured by OIV methods (19); and absorbance at 280 nm (polyphenolic content) was measured following the spectrophotometric method, with a 1-mm cell (20). Maturity index was calculated as the ratio between soluble solid (°Brix) and titratable acidity (g tartaric acid/L juice).

The concentration of soluble proteins was determined following the Bradford method (21). Results were expressed in mg of bovine serum albumin (BSA) per kg of grape.

The concentrations of organic acids, glucose, fructose, and glycerol were determined by ionic exchange/size exclusion HPLC–RID as described by López-Tamames et al. (22).

Polysaccharides were extracted from grape juice with ethanol, following the method of Segarra et al. (23). Total, neutral, and acid polysaccharide contents were determined by spectrophotometric methods. Starting with the same ethanol extract, polysaccharides of different molecular mass ( $M_r$ ) were also separated by gel permeation chromatography (GPC) and quantified as described by López-Barajas et al. (24). Their molecular mass was identified with a calibration curve obtained with six poly(acrylic acid)s (Aldrich) of  $M_r$  values between 240 000 and 2000.

**Statistical Methods.** Using Statgraphics 7.0 (25), principal components analysis (PCA) was performed. Correlation regression was applied to the physical and chemical characteristics of all the samples, and analysis of variance (one-way ANOVA) was performed using the yield as an independent variable and all the parameters as dependent variables.

## RESULTS AND DISCUSSION

The principal component analysis (PCA) was carried out with the main parameters studied: pH, sugars, titratable acidity, maturation index, and yield (kg of grape/ha) (Figure 1). Two groups with distinct yield were obtained. One of them, in the top zone of the figure, grouped the grapes from fields with yields higher than 10 500 kg/ha, and the lower zone grouped the samples with yields lower than 10 500 kg/ha. The analysis of variance (one-way ANOVA) shows the compositional differences between these two groups (<10 500 kg and >10 500 kg grape/ha) (Table 1). Both titratable acidity and pH were

**Table 1.** Confidence Intervals of the Means of Significance Levels ( $p$ ) of the Parameters Which Had Significant Differences between Low Yield (<10 500 kg/ha) and High Yield (>10 500 kg/ha)

parameter	significance level $p$	low yield (<10 500 kg/ha) ( $n = 9$ )	high yield (>10 500 kg/ha) ( $n = 11$ )
pH	0.036	3.52–3.63	3.64–3.74
sugars (g/kg)	ns	87.58–100.60	88.63–100.41
titratable acidity (g/kg)	0.045	2.13–2.51	2.51–2.85
maturation index	ns	4.39–5.36	4.37–5.25
absorbance 280 nm	ns	0.67–0.84	0.53–0.69
protein (mg/kg)	0.000	95.50–117.02	137.05–156.51
total polysaccharides (mg/kg)	0.026	473.40–555.17	389.75–463.68
acid polysaccharides (mg/kg)	ns	171.28–208.79	175.56–209.49
neutral polysaccharides (mg/kg)	0.001	296.47–351.98	209.08–259.29
$M_r$ 206 000–193 000 <sup>a</sup> (mg/kg)	0.012	3.05–10.33	12.45–19.03
$M_r$ 62 000–48 000 (mg/kg)	0.001	192.58–231.32	132.38–167.43
$M_r$ 28 000–24 000 (mg/kg)	0.001	31.74–41.17	16.64–25.17
$M_r$ 7000–5000 (mg/kg)	0.001	16.84–20.32	11.24–14.38
$M_r$ 3000–2000 (mg/kg)	ns	9.53–17.65	11.17–18.52
$M_r$ <2000 (mg/kg)	ns	193.28–272.31	181.07–252.55
citric acid (g/kg)	0.016	0.15–0.38	0.009* – 0.09
tartaric acid (g/kg)	0.010	2.59–3.16	3.34–3.83
galacturonic acid (g/kg)	ns	0.15–0.19	0.18–0.20
malic acid (g/kg)	ns	1.16–1.47	1.28–1.57
succinic acid (g/kg)	ns	< 0.009*	< 0.009
lactic acid (g/kg)	ns	< 0.009	< 0.009
glucose (g/kg)	ns	58.94–64.67	54.61–59.78
fructose (g/kg)	ns	56.25–56.95	52.01–56.95

<sup>a</sup>  $M_r$  = Molecular mass; ns = not significant; \* limit of quantitation.

significantly higher in samples with higher yield (Table 1). However, the maturation index did not vary significantly. Thus, although the acidity was lower, the samples with lower yield were not riper than the other group. Lower yield did not imply a higher maturation index.

Furthermore, ANOVA results showed that, like pH, protein content was higher in high-yield samples (>10 500 kg/ha) (Table 1). The correlation between pH and protein content has been reported elsewhere by Murphey et al. (26). The enzymatic activity that hydrolyzes structural proteins probably depended on pH.

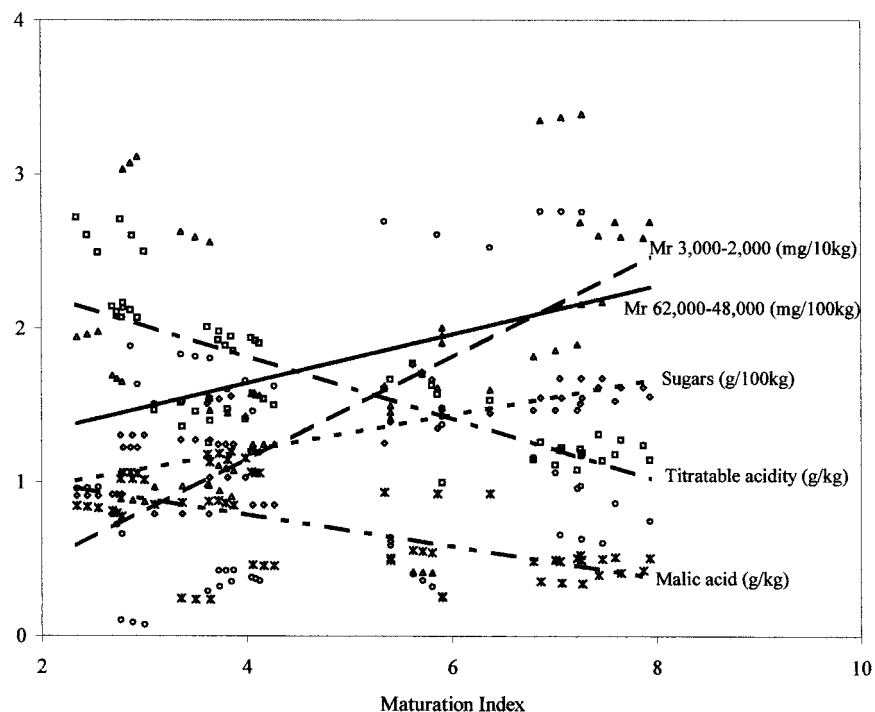
Polysaccharide concentrations were lower in the samples obtained from a field with high yield. A large number of vineyards per hectare may result in thinner cellular walls and grape skin and lower polysaccharide content owing to the main distribution of nutrients in fruits. Total and neutral polysaccharides, and  $M_r$  206 000–193 000,  $M_r$  62 000–48 000,  $M_r$  28 000–24 000, and  $M_r$  7000–5000 polysaccharide fractions significantly differed between these two groups (Table 1). According to Jackson (2), the yield can directly affect grape composition by intrinsic changes. Thus, we established the distinct behavior of these two groups of samples [low yield (<10 500 kg of grape/ha) and high yield (>10 500 kg of grape/ha)] depending on their yield (Table 2). The correlation between polysaccharides and yield was confirmed in each group by regression analysis. In low-yield samples, this parameter presents negative correlation with total and neutral polysaccharide content. In samples from the other group, total, acid, and neutral polysaccharide content, and  $M_r$  206 000–193 000,  $M_r$  62 000–48 000,  $M_r$  28 000–24 000, and  $M_r$  < 2000 polysaccharide fractions were significantly correlated with yield.

Moreover, in the PCA (Figure 1), the vector of maturation index was near that of sugars and opposite that of titratable acidity as confirmed by regression analysis. Figure 2 shows the association between maturation index and other parameters. Most of these correlations were expected, because the maturation

**Table 2.** Correlation Coefficients ( $r$ ) and Significance Levels ( $p$ ) between Yield and Maturation Index and the Other Parameters Determined

parameter	low yield (<10 500 kg/ha) ( $n = 9$ )				high yield (>10 500 kg/ha) ( $n = 11$ )			
	yield		MI <sup>a</sup>		yield		MI <sup>a</sup>	
	$r$	$p$	$r$	$p$	$r$	$p$	$r$	$p$
pH	-0.430	<0.050	0.474	<0.050	-0.456	<0.010	0.618	<0.001
sugars	-0.466	<0.050	0.771	<0.001			0.750	<0.001
titratable acidity			-0.850	<0.001			-0.757	<0.001
absorbance 280 nm			-0.396	<0.050				
protein content			0.521	<0.010				
total polysaccharides	-0.645	<0.001	-0.451	<0.050	-0.555	<0.001		
acid polysaccharides			-0.780	<0.001	-0.544	<0.010		
neutral polysaccharides	-0.618	<0.001			-0.528	<0.010	0.398	<0.050
$M_r$ 206 000–193 000					-0.366	<0.050		
$M_r$ 62 000–48 000					-0.529	<0.010	0.554	<0.001
$M_r$ 28 000–24 000					-0.401	<0.050	0.529	<0.010
$M_r$ 3000–2000							0.550	<0.001
$M_r$ <2000			-0.427	<0.050	-0.372	<0.050		
glucose			0.849	<0.001				
fructose			0.859	<0.001			0.371	<0.050
tartaric acid	0.593	<0.010						
galacturonic acid			-0.417	<0.050				
malic acid			-0.592	<0.010			-0.647	<0.001
succinic acid							0.450	<0.010
lactic acid	-0.431	<0.050						

<sup>a</sup>MI= Maturation index;  $M_r$ = molecular mass.



**Figure 2.** Regression analysis between the maturation index and sugars (g/kg) ( $r = 0.7458$ ), titratable acidity (g tartaric acid/kg) ( $r = -0.7728$ ), malic acid (g/kg) ( $r = -0.6024$ ), and polysaccharides of  $M_r$  62 000–48 000 (g/kg) ( $r = 0.3629$ ), and polysaccharides of  $M_r$  3000–2000 (g/kg) ( $r = 0.4001$ ). All relations were significant ( $p < 0.05$ ).

index is the ratio between sugars ( $r = 0.7458$ ;  $p < 0.001$ ) and titratable acidity ( $r = -0.7728$ ;  $p < 0.001$ ). Furthermore, the correlation with malic acid was negative ( $r = -0.6024$ ;  $p < 0.001$ ) at the highest maturation index. The same correlations were found when these two groups were studied separately (**Table 2**). In both groups, the maturation index was positively correlated with pH and sugars and negatively correlated with titratable acidity and malic acid.

Moreover (**Figure 2**), the maturation index was positively correlated with some polysaccharide fractions ( $M_r$  62 000–48 000 and  $M_r$  3000–2000). According to Flanzy (27), during the course of maturation cell-walls soften because pectins from

the middle lamella are solubilized by endopolygalacturonase and pectinmethylesterase. That may account for the increase in polysaccharides fractions at higher maturation indices. When the two groups were studied separately, in the group of high yield (> 10 500 kg/ha) the maturation index was also positively correlated with the polysaccharide fractions of  $M_r$  62 000–48 000,  $M_r$  28 000–24 000, and  $M_r$  3000–2000 (**Table 2**). According to López-Barajas (18), the polysaccharide fractions  $M_r$  62 000–48 000 and 3000–2000 affect foam properties. Despite the reduction in content of these polysaccharide fractions in the course of the wine production (mean decrease of 32%) (18), its presence in wines benefits the foam capacity.

In the group of low yield, the maturation index was positively correlated with protein content and negatively correlated with total and acid polysaccharide, and with the polysaccharide fraction of  $M_r < 2000$  (Table 2). Only in the group of low yield were polyphenols negatively correlated with maturation index (Table 2). Several factors may modify the polyphenol content in grapes, e. g., sun exposure, temperature, topography, and kind of pruning. The evolution of polyphenols during maturation is not uniform. Lamuela (28) established a negative correlation between polyphenols and maturation index in a Parellada variety. In the current study, polyphenols presented a positive correlation with polysaccharide content ( $r = 0.5220$ ;  $p < 0.01$ ).

When the vines produce more than 10 500 kg of grape/ha (high yield), the correlations between grape parameters (Table 2) and yield or maturation index differ from those of low-yield samples. This may be due to differences in physiology or metabolism of the plant when the production is over 10 500 kg of grape/ha.

In conclusion, the yield (kg of grape/ha) may not affect the maturation index value, but it could modify ripening, and furthermore, grape composition. Polysaccharide content was higher at lower yield. It would be useful to monitor the yield in vines destined to elaborate Cava. We could thus obtain grapes with optimal composition.

#### ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Segura Viudes SA, Castellblanch SA, and Freixenet SA wineries.

#### LITERATURE CITED

- Christensen, L. P.; Bianchi, M. L.; Lynn, C. D.; Kasimatis, A. N.; Miller, M. W. The effects of harvest date on Thompson seedless grapes and raisins. I. Fruit composition, characteristics and yield. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 10–16.
- Jackson, D. I.; Lombard, P. B. Environmental and Management practices affecting grape composition and wine quality – A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 409–430.
- Keller, M.; Arnink, K. J.; Hrazdina, G. Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. I. Effects on grapevine growth, fruit development, and ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 333–340.
- Palacios, V. M.; Nebot Sanz, E.; Pérez Rodríguez, L. Use of factor analysis for the characterization and modelling of maturation of Palomino grapes in the Jerez region. *Am. J. Enol. Vitic.* **1997**, *48*, 317–322.
- Zoecklein, B. W.; Wolf, T. K.; Duncan, N. W.; Judge, J. M.; Cook, M. K. Effects of fruit zone removal on yield, fruit composition, and fruit rot incidence of Chardonnay and White Riesling (*Vitis vinifera* L.) grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, *43*, 139–148.
- Gomez, E.; Martinez, A.; Laencina, J. Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *J. Sci. Food and Agric.* **1995**, *67*, 229–233.
- Morrison, J. C.; Noble, A. C. The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet Sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, *41*, 193–200.
- Hunter, J. J.; Ruffner, H. P.; Volschenk, C. G.; Le Roux, D. J. Partial defoliation of *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon/99 Richter: Effect on root growth, canopy efficiency, grape composition, and wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 306–314.
- Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 77–85.
- López-Barajas, M.; Viu-Marco, A.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. and de la Torre-Boronat, M. C. Foaming in grape juices of white varieties. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2526–2529.
- Andrés-Lacueva, C.; López-Tamames, E.; Lamuela-Raventós, R. M.; Buxaderas, S.; de la Torre-Boronat, M. C. Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 989–995.
- Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R. M.; Buxaderas, S.; de la Torre-Boronat, M. C. Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wines (Cava). 2. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *47*, 2520–2525.
- Brissonnet, F.; Maujean, A. Identification of some foam-active compounds in champagne base wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1991**, *42*, 97–102.
- Brissonnet, F.; Maujean, A. Characterization of foaming proteins in champagne base wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1993**, *44*, 297–301.
- López-Barajas, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S.; de la Torre-Boronat, M. C. Effect of vinification and variety on foam capacity of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1998**, *49*, 397–402.
- Pueyo, E. Identification, origin and modifications of the chemical composition that affect the foaming characteristics of cava. Ph.D. Dissertation, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Spain, 1994.
- Pueyo, E.; Martín-Alvarez, P. J.; Polo, C. Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 518–524.
- López-Barajas, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S.; Suberbiola, G.; de la Torre-Boronat, M. C. Influence of wine polysaccharides of different molecular mass on wine foaming. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 146–150.
- Office International de la Vigne et du Vin. *International Analysis Methods of Wines and Musts*. OIV: Paris, 1990.
- Somers, T. C.; Evans, M. E. Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO<sub>2</sub>, “chemical age”. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, *28*, 279–287.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- López-Tamames, E.; Puig-Deu, M.; Teixeira, E.; Buxaderas, S. Organic acids, sugars and glycerol content in white winemaking products determined by HPLC: relationship to climate and varietal factors. *Am. J. Enol. Vitic.* **1996**, *47*, 193–198.
- Segarra, I.; Lao, C.; López-Tamames, E.; de la Torre-Boronat, M. C. Spectrophotometric method for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 564–570.
- López-Barajas, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Improved size-exclusion high-performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 339–347.
- Statgraphics 7.0, Statistical graphics systems; Manugistics Inc.: Rockville, MD, 1993.
- Murphey, J. N.; Spayd, S. E.; Powers, J. R. Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and white Riesling juice and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **1989**, *40*, 199–207.
- Flanzky, C. Les glucides. In *Oenologie: Fondements Scientifiques et Technologiques*; 1st ed.; Technique et Documentation: Paris, France, 1999; pp 66–96.
- Lamuela, R. M. El contenido polifenólico de las variedades de uva Xareló y Parellada y su interés en la obtención de vinos blancos de calidad. Ph.D. Dissertation, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Spain, 1991.

Received for review January 10, 2002. Revised manuscript received May 3, 2002. Accepted May 6, 2002. This study was made possible by financial assistance from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) and Generalitat de Catalunya (Spain) with the projects ALI97-0396-CO2-01 and 2001SGR00131, respectively, and from Universitat de Barcelona for support of M. R.-A.

#### 4.2.3 Evaluación de la composición volátil de zumos de albaricoque, melocotón y pera según dos tratamientos pectolíticos

**Publicación:** Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Assessment of the volatile composition of apricot, peach and pear juices according to two pectolytic treatments. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53 (20), 7837-7843.

Con el objeto de estudiar el efecto de los enzimas pectolíticos en las sustancias volátiles, se han preparado, a escala de laboratorio, zumos de 3 frutas: albaricoque, melocotón y pera. Para cada fruta se han obtenido tres tipos de zumo: el control, al que no se le ha aplicado ningún tratamiento enzimático, un segundo zumo que se ha obtenido mediante un enzima pectolítico que facilita la extracción y el tercer tipo, al cual se ha aplicado un enzima de clarificación. Para cada fruta, a su vez, se han utilizado 2 variedades o 2 lotes. Los tratamientos se han aplicado por triplicado para minimizar la variabilidad derivada de la propia elaboración.

En estas muestras se han determinado, por un lado, el contenido en polisacáridos totales y la composición según la masa molecular por cromatografía de gel permeación (GPC), así como los aromas mediante la Microextracción en Fase Sólida por Espacio de Cabeza (HS/SPME) y otros parámetros rutinarios de control.

Aunque el análisis de la varianza (ANOVA) muestra que la acidez, los azúcares y el índice de maduración son distintos según la fruta, cuando se tiene en cuenta el tratamiento enzimático, se observa que éste aumenta la acidez, probablemente por liberación de ácidos orgánicos. También como era de esperar, el contenido en polisacáridos se modifica según el tratamiento con enzimas pectolíticos. El enzima de extracción incrementa los polisacáridos totales y ácidos y los dos enzimas incrementan las fracciones de menor peso molecular, probablemente, por rotura de fracciones de peso molecular medio. Cuando se realiza el análisis discriminante se ve



cómo las muestras se separan claramente en función del tratamiento enzimático aplicado, obteniendo un acierto superior al 75% en la validación cruzada.

El análisis de HS/SPME-GC-MS ha permitido la caracterización de compuestos volátiles: Se obtienen 72 compuestos en albaricoque, 80 en melocotón y 96 en pera; Se han identificado alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, terpenos, hidrocarburos, furanos, C<sub>13</sub>-norisoprenoides y ácidos carboxílicos. A diferencia del estudio previo con zumos comerciales, se ha utilizado una fibra triple DVB/CAR/PDMS, lo que ha permitido detectar C<sub>6</sub> aldehídos, cetonas y alcoholes que difícilmente se extraían con la fibra de PDMS. En albaricoque y melocotón se han detectado, por primera vez, algunos norisoprenoides, el  $\alpha$ -isoforon y el teaspirano B. En las tres frutas se detectan sin dificultad los compuestos previamente descritos como productos de impacto. El efecto del tratamiento enzimático sobre los volátiles es cuantitativo y en ningún caso se han constatado variaciones cualitativas del perfil.

Los enzimas utilizados en los zumos pueden justificar las diferencias halladas de compuestos volátiles. En albaricoque, las muestras control son las más pobres en volátiles, sobretodo en terpenos y norisoprenoides. Esto podría ser debido al efecto de la actividad enzimática sobre los polisacáridos, ya que el valor de polisacáridos solubles y algunas fracciones son superiores en las muestras control que en las tratadas. Una mayor retención de aromas en el zumo puede dificultar su extracción por la fibra. También podría ocurrir que la actividad glicosídica concomitante de muchas preparaciones enzimáticas, podría liberar los volátiles de sus aglicones y perderse fácilmente durante la elaboración del zumo. En el melocotón, las muestras tratadas con enzima de extracción son las más pobres en aromas, entre ellos dos del grupo de las lactonas. Sólo el benzaldehído aumenta con este enzima. En este caso, los zumos obtenidos con enzimas de extracción son los que tienen valores más altos de polisacáridos solubles y de algunas de sus fracciones. En pera se separan los zumos controles de los tratados enzimáticamente. Los zumos de clarificación enzimática son

más pobres que el resto de las muestras, especialmente en ésteres de decadienoato (compuestos impacto en este tipo de fruta). Este enzima, por tanto, no parece el más adecuado para el aroma de estos zumos.

En conclusión, los datos obtenidos dan lugar a un comportamiento distinto en función de la fruta sobre la que se aplica el tratamiento enzimático. En el caso del albaricoque, el tratamiento podría favorecer aromas generalmente agradables como terpenos y norisoprenoides, mientras que en el caso del melocotón y de la pera, no serían los enzimas más apropiados, ya que disminuyen el contenido en el espacio de cabeza de lactonas y ésteres de decadienoato, respectivamente, y favorecen la retención de volátiles que participan en aromas frutales.

## Assessment of the Volatile Composition of Juices of Apricot, Peach, and Pear According to Two Pectolytic Treatments

MONTSERRAT RIU-AUMATELL, ELVIRA LÓPEZ-TAMAMES, AND  
 SUSANA BUXADERAS\*

Departament de Nutrició i Bromatologia, Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA),  
 Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

The behavior of volatile compounds according to two enzymatic treatments applied during the manufacture of fruit juice is described. More than 80 compounds were detected of a wide range of chemical families (alcohols, aldehydes, ketones, terpenoids, esters, norisoprenoids, ...). Theaspirane and  $\alpha$ -isophoron were tentatively identified for the first time in apricot and peach fruits. The enzymes used, for extraction or clarification of fruit juices, modified the polysaccharides separated by molecular weight and the content of soluble polysaccharides. This could indicate differences in the fruit juice matrix, which could be related to observed changes in the volatile profile. In apricot, the enzymes enhanced the juice in terpenes and norisoprenoids as varietal compounds. In peach and pear, the enzymes used did not favor the amount of lactones and decadienoate esters, the character impact compounds, respectively.

**KEYWORDS:** Volatile compounds; polysaccharides by  $M_w$ ; pectolytic enzymes; SPME; GPC

### INTRODUCTION

Apricot, peach, and pear are some of the most important noncitric fruits in Mediterranean countries. Due to their nutritive value and aroma, these fruits are widely consumed as fresh fruit, canned fruit, and processed juice (1). Carbohydrates, organic acids, and phenolic compounds are the major constituents of fruit, and these compounds are useful for monitoring the quality of juices (2). According to Azondanlou et al. (3) the sum of sugars, organic acids, and volatile compounds (4, 5) as well as the color, shape, and texture determine the sensory properties of fruits and vegetables. The formation of aroma compounds in fruit is a dynamic process during which the concentration of volatiles changes both qualitatively and quantitatively. Some studies about the influence of the degree of maturation in volatile composition are reported (6–12). After the harvest of the fruit, the technological manufacture could affect the flavor (1, 13–17). In a previous study by Riu-Aumatell et al. (4) a wide variability of volatile compounds was detected in commercial fruit juices and nectars of apricot, peach, and pear, but only a few compounds were detected in all of the samples of the same fruit. This could indicate some variability due to the technology used in its production.

On the other hand, the nature of the food matrix affects the concentration of the odorants in the headspace, probably because there are selective interactions between some components of the fruit juice matrix and some odorants, thus affecting their volatility. Therefore, the physicochemical properties of the volatile compounds in combination with the chemical nature

and structure of the food matrix can modify the concentration of the volatile compounds and its perception (18).

Pectolytic enzymes were used in the fruit juice manufacture to enhance the juice extraction and also to clarify the juice (19). These enzymes will modify the polysaccharides composition and probably will affect the behavior of the volatile compounds. No published studies exist about the effect of the pectolytic enzymes over the volatile composition of fruit juices except some studies on grape juice (20, 21). The aim of this work was to assess whether the use of pectolytic enzyme preparation, in addition to facilitating juice processes, could change the volatile composition of apricot, peach, and pear juices. The polysaccharides composition by molecular weight was considered to be due to their capacity to modify the volatile profile. For each fruit (apricot, peach, and pear) three kinds of samples, controls, samples elaborated with an extraction enzyme, and samples treated with clarification enzyme, were compared.

### MATERIALS AND METHODS

**Samples.** Twenty kilograms each of apricot, peach, and pear were purchased at commercial maturity from commercial establishments in Barcelona (Spain) and stored at 5 °C. Two types of each fruit were studied: two different lots of the cultivar Galta Roja for apricot and two varieties for peach (Maria Bianca and Royal Glory) and pear (Ercolini and Conference). The different lots of apricot were purchased on different days. Each 20 kg of fruit was divided in three groups to obtain three types of samples according to the enzymatic treatment applied. At the same time, the three treatments (control; clarification enzyme; extraction enzyme) were applied three times to avoid the variability of manufacture.

**Preparation of Juice and Enzymatic Treatment.** Prior to juicing, the fruits were washed with water and the apricot and peach stones were

\* Author to whom correspondence should be addressed (telephone 34 93 4024510; fax 34 93 4035931; e-mail susanabuxaderas@ub.edu).

removed. Citric acid and sodium fluoride were added to the fruit (at 3 and 1 g/L, respectively) to preserve the samples. Three types of each fruit were obtained: controls without enzymatic treatment, samples treated with endozyme Pectofruit polyfruit (Spindal group AEB, Gretz-Amainvilliers, France) to increase the juice yield (extraction enzyme), and samples clarified with the endozyme Pectofruit pear (Spindal group AEB) to clarify the juice (clarification enzyme). The samples were coarsely cut and then crushed with a liquidizer (7000g, 10 s; Oster Designer, Delray Beach, FL), filtered with a nylon mesh, and centrifuged (2500g, 10 min, 10 °C) to provide the chemical analysis. The clear juice was bottled and stored at -18 °C. Extraction enzyme (5 g/100 kg) was added before sample crushing, whereas clarifying enzyme (5 g/100 L) was added after sample crushing. Both enzymes were added at room temperature. At the same time, clear juice volume was measured to calculate the juice output as milliliters of fruit juice per 100 g of fruit.

**Chemicals.** Hexane, ethyl acetate, ethanol, hexanal, 3-methylbutyl acetate, 1,2-dimethylbenzene, limonene, (*E*)-2-hexenal, 1-hexanol, ethyl octanoate, acetic acid, 2-furancarboxyaldehyde, benzaldehyde, (*E*)-2-nonenal, ethyl nonanoate, ethyl decanoate, heptanoic acid, hexanoic acid, ethyl dodecanoate, and 2-phenylethanol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ethyl hexanoate, 6-methyl-5-hepten-2-one, linalool, 1-octanol, 3-nonanol, geraniol, and 2-methylhexanoic acid were purchased from Fluka (St. Louis, MO), whereas 4-methyl-2-pentanol, methyl acetate, 3-methylbutanal, ethyl propanoate, propyl acetate, 1-butanol, ethyl butanoate, ethyl 3-methylbutanoate, butyl acetate, 3-pentenol, hexyl acetate, (*Z*)-3-hexenol, fenchone, (*E*)-2-hexenol, 2-octanol, octyl acetate, isobornyl acetate, butanoic acid, 1-decanol,  $\alpha$ -terpineol, (*Z,E*)- $\alpha$ -farnesene, (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene, 2-decanol, 2-phenylethyl acetate, nerol,  $\beta$ -ionone, cinnamaldehyde,  $\gamma$ -nonalactone, octanoic acid,  $\gamma$ -decalactone, and decanoic acid were purchased from TCI (Chuo-Ku, Tokyo, Japan).

**Analytical Methods.** pH, soluble solid content (determined by refractometry), and titratable acidity were determined following the Codex recommendations (22). Maturation index was calculated as the ratio between soluble solids ( $^{\circ}$ Brix) and titratable acidity (grams of citric acid per liter of juice). Glucose, fructose, and sucrose were assessed through the enzymatic method (23).

**Polysaccharides** were extracted from fruit juice following the methods of Segarra et al. (24). Total and acid polysaccharide contents were determined by using a spectrophotometric method (24). Polysaccharides of different molecular masses were separated by gel permeation chromatography (GPC) and quantified as described by López-Barajas et al. (25). Their molecular mass was identified with a calibration curve obtained with six polyacrylic acids (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) of  $M_r$  values between 240 and 2 kDa.

**Volatile compounds** were extracted with a headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method. The SPME fiber used was 2 cm of 50/30  $\mu$ m divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane coating bonded to a fused silica core (DVB-CAR-PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA). This fiber was used previously in a wide range of beverages such as wine (26, 27), orange juice (28), and apricot and tomato juices (3). The HS-SPME and the chromatographic conditions were the same as used by Riu-Aumatell et al. (4) for the volatile compounds determination in commercial fruit juices and nectars. A 5 mL juice sample was put in a 10 mL vial and then extracted at 40 °C for 30 min with magnetic stirring (700g). Volatiles were semiquantified using a 6890N network gas chromatograph equipped with a 5973 network mass selective detector (MS) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The capillary column was a Supelcowax 10 with PEG 20M stationary phase (CW) (30 mm  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m) (Bellefonte, PA). Helium was used as a carrier gas. The injector and detector temperatures were 250 and 280 °C, respectively. The temperature program was from 60 °C (held for 5 min) to 240 °C (held for 10 min) at 3 °C/min using splitless injection mode. Electron impact mass spectra were recorded at a voltage of 70 eV ionization energy in the 15–250 u mass range at 2 scans/s.

Volatile compounds were identified by comparing them with two spectral libraries (NIST/EPA/MSDC 49K Mass Spectral Database, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA; and Registry of Mass Spectral Data with Structures, Wiley 6.1, New York), as well as with relative retention times when chemical standards were available. We also used

the retention index standards (Sigma, St. Louis, MO) of C8 and C32 aliphatic hydrocarbons to calculate the Kovats index (KI) on CW and HP-5MS columns (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) of the same dimensions as the analytical one. Quantification was carried out according to the internal standard method. The volatile compounds identified were quantified by considering the relative response factor to be 1 and were expressed as milligrams per liter equivalents ( $\times 100$ ) of IS solution of 4-methyl-2-pentanol or 2-methylhexanoic acid (500 mg/L) prepared in methanol (SDS, Peypin, France). Compounds with a Kovats index from 812 to 1524 (CW phase) were quantified with 4-methyl-2-pentanol, whereas compounds with a Kovats index from 1530 to 2258 (CW phase) were quantified with 2-methylhexanoic acid.

**Statistical Procedures.** Discriminant analysis and multifactor ANOVA were performed with general and polysaccharide parameters to test the differences obtained between the two enzymatic treatments on the samples of fruit juices. To group volatile compounds that were affected by enzymes in each fruit studied, principal component analysis (PCA) was also applied. These statistical analyses were carried out by using the program Statgraphics Plus 5.1 (29).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Table 1** provides the general parameter means including soluble polysaccharide composition and apricot, peach, and pear handmade juice polysaccharides separated by molecular weight according to the enzymatic treatment applied. The two varieties or two lots of each fruit ( $n = 2$ ) and treatment triplicates ( $n = 3$ ) were used to obtain the mean value ( $n = 6$ ). When the multifactor ANOVA was performed (**Table 1**), it could be observed that the general parameters were significantly different according to the fruit considered. Peach was characterized by the highest levels of sucrose (6), apricot juice by glucose values, and pear juice by the highest content of fructose. Low pH and low total acidity were characteristic for peach and pear, respectively. When the enzymatic factor was considered, the two treatments decreased significantly the pH and caused an increase of 13% in sample acidity. Probably, the enzymes liberate several organic acids such as galacturonic acid due to the methylesterase activity present in enzymatic preparations and, thus, increase the acidity of the juice. As expected, the yield obtained (milliliters of juice per 100 g of fruit) with the extraction enzyme was higher than controls in all fruits studied, whereas the clarification enzyme in apricot and pear caused a yield decrease.

The behavior of polysaccharide values depended on the differences between varieties or between lots (data not shown). However, the enzymatic treatment influences the composition in total polysaccharides and polysaccharides of medium and low molecular weight (**Table 1**). The extraction enzyme increases the value of total soluble polysaccharides (41% on the average), especially for peach and pear fruits. The values of small polysaccharide fractions ( $M_r$  1.7–1.3 and  $<1000$ ) increased with the two enzymatic treatments, probably because they break down the medium polysaccharides ( $M_r$  100–85 and 45–30), which at the same time decreased. Comparing the effect of both enzymes, the smallest polysaccharides ( $M_r$   $<1000$  Da) were higher in the juices treated with extraction enzyme. This may be explained by the higher extraction capacity of soluble polysaccharides of fruit and/or by the higher extraction time, which favors the contact between fruits and their juices.

Moreover, the discriminant analysis was carried out with the parameters of **Table 1** in order to group the samples according to the enzymatic treatment (**Figure 1**). The discriminant function 1 justified 76% of the variability, and it was defined for polysaccharides of  $M_r$  45–30 and 1.7–1.3 kDa with discriminant function coefficients of 1.244 and -0.708, respectively. Function 2 justified 18% of the variability, and it was defined

**Table 1.** Mean ( $n = 6$ ) of General Parameters and Carbohydrate Composition of Fruit Juices and Significance ( $p$ ) Obtained by Multifactor ANOVA

	apricot			peach			pear			A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>	AB <sup>c</sup>
	enzyme treatment			enzyme treatment			enzyme treatment					
	control	extraction	clarification	control	extraction	clarification	control	extraction	clarification			
pH	4.40	4.09	4.23	3.81	3.70	3.72	4.28	4.10	4.18	0.0001	0.0001	ns <sup>d</sup>
°Brix (g/L)	12.73	13.87	13.01	12.05	9.08	8.78	11.49	12.94	10.85	0.0001	ns	0.0197
total acidity (g of citric acid/L)	4.32	4.45	4.91	4.66	5.25	5.68	2.21	2.66	2.71	0.0001	0.0270	ns
maturation index <sup>e</sup>	3.03	3.22	2.77	2.58	1.85	1.56	5.23	4.97	4.03	0.0001	0.0040	ns
yield (mL of juice/100 g fruit)	73	78	55	63	82	67	70	71	63	ns	0.0047	ns
glucose (g/L)	0.41	0.34	0.36	0.12	0.14	0.21	0.14	0.15	0.18	0.0001	ns	ns
fructose (g/L)	0.31	0.25	0.27	0.16	0.16	0.23	0.54	0.59	0.65	0.0001	ns	ns
sucrose (g/L)	0.21	0.12	0.16	0.50	0.56	0.41	0.02	0.03	0.02	0.0001	ns	ns
TPS <sup>f</sup> (g/L)	8.53	8.15	5.65	5.45	8.19	4.79	3.67	7.11	4.49	ns	0.0153	ns
APS <sup>g</sup> (g/L)	8.31	6.17	4.32	2.66	6.78	3.01	3.32	4.43	3.48	0.0187	ns	ns
M <sub>r</sub> 540–440 kDa	0.02	0.04	0.03		0.04		0.09	0.12	0.03	0.0046	ns	ns
M <sub>r</sub> 320–215 kDa				0.05	0.17	0.09	0.29		0.02	ns	ns	0.0070
M <sub>r</sub> 100–85 kDa	2.39	0.46	0.17	1.65	0.60	0.09	0.27	0.51	0.09	ns	0.0020	ns
M <sub>r</sub> 45–30 kDa	2.31	0.96		1.16	0.92	0.04	1.25	0.53	0.06	0.0269	0.0001	0.0292
M <sub>r</sub> 17–13 kDa	1.22	0.38	0.43	0.78	0.63	0.63	0.41	0.67	0.57	ns	ns	ns
M <sub>r</sub> 1.7–1.3 kDa	1.00	0.86	0.50	0.27	1.23	0.47	0.38	1.05	0.52	ns	0.0329	ns
M <sub>r</sub> < 1000 Da	2.29	5.45	4.52	1.54	4.59	3.48	0.97	4.24	3.21	ns	0.0001	ns

<sup>a</sup> A, fruit factor. <sup>b</sup> B, enzymatic treatment factor. <sup>c</sup> AB, interaction between fruit and enzymatic treatment factors. <sup>d</sup> Not significant result. <sup>e</sup> Maturity index was calculated as the ratio between soluble solid (°Brix) and total acidity (g of citric acid/L of juice). <sup>f</sup> Total polysaccharides. <sup>g</sup> Acid polysaccharides.

for polysaccharides of low molecular weight (<1000 Da) and glucose content with discriminant functions coefficients of  $-0.759$  and  $0.763$ , respectively (data not shown). The separation of the juices elaborated with three different methods was >75% according to the classification made by cross-validation. Ninety-four percent of the juices enzymatically clarified were correctly classified (the only sample wrongly placed was assigned in the other enzyme-treated group), and 77% of the juices treated with extraction enzyme were correctly placed (three samples were wrongly placed; one of them in the control group and the other two in the enzymatically clarified group).

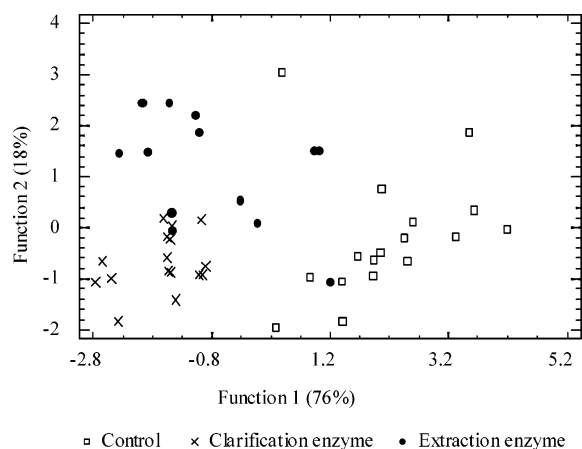
**Characterization of Volatile Composition.** The volatile profile obtained by GC-MS is shown in **Table 2**. Seventy-two compounds in apricot samples, 80 compounds in peach, and 96 compounds in pear juice were detected. In **Table 2** can be observed the list of volatile compounds sorted through the retention time obtained with CW phase, the KI obtained by HP-5 phase, the identification method (A, comparison with retention time based on the use of reference standards; B, mass spectrum), and the median value ( $n = 18$ ) of each fruit: two varieties or two lots (2) for three replicates of treatment (3) and triplicates

determination (3). The significance levels ( $p$ ) obtained by analysis of variance among the three types of samples according to the enzymatic treatment are also shown in **Table 2** (enzyme factor). The volatile compounds identified only by mass spectrum were tentatively identified.

A wide range of chemical families is present in **Table 2**: aldehydes, ketones, alcohols, esters, lactones, terpenoids and aromatic compounds, hydrocarbons, furans, C<sub>13</sub>-norisoprenoids, and carboxylic acids. By comparison of the results in the current study with those of Riu-Aumatell (4), aldehydes and alcohols of six carbons were better detected, probably because the triple-phase fiber has more polar characteristics and the extraction capacity of these compounds was higher than that of PDMS fiber used in the previous study. The presence of C6 compounds was probably due to lipoxygenase activity, which was initialized by the disruption of the fruit tissues when the juice was extracted (10).

Some compounds are of special significance because of their importance for fruit sample aroma. The most abundant volatile compounds determined in apricot juices in the current study were benzaldehyde, some esters, norisoprenoids, and terpenoid compounds (**Table 2**). The characteristic contents of benzaldehyde, linalool, and esters were described previously by Guichard (30, 31) and Takeoka et al. (32) for apricot.

Esters, alcohols, and terpenoids were the main peach compounds (**Table 2**). Also, the lactones previously described in the literature (1, 5–7, 9, 13) as responsible of peach flavor were clearly determined. In peach samples, benzaldehyde, methyl and ethyl acetate, and some lactones were the quantitatively main compounds (**Table 2**). Benzaldehyde, described as typical of stone fruits, was responsible for the almond nutty and stone fruit aroma in the peach pulp (7, 33) and probably arises from the cyanogenic glycoside amygdalin, a typical constituent of *Prunus* spp. (13, 32). Some norisoprenoids tentatively identified as  $\alpha$ -isophoron ( $m/z$  39, 82, 138) and theaspirane B ( $m/z$  82, 96, 138) were detected for the first time in apricot and peach samples (**Table 2**). Norisoprenoids were compounds from the degradation of carotenoids, which have significant aroma impact in other fruits such as grape, apple, lychee, and mango (28).



**Figure 1.** Discriminant analysis of general parameters of apricot, peach, and pear according to the enzymatic treatment used.

**Table 2.** Volatile Compounds Identified by HS-SPME and GC-MS by Fruit, Mean, and Significance Value (*p*)

		KI CW phase <sup>a</sup>	KI HP5 phase <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	apricot ( <i>n</i> = 18)	enzyme factor <sup>g</sup>	peach ( <i>n</i> = 18)	enzyme factor	pear ( <i>n</i> = 18)	enzyme factor
1	hexane	812	600	A, B	1.94 <sup>f</sup>		1.66		1.76	
2	ethanal <sup>d</sup>	837	nd <sup>e</sup>	B	4.66		1.59		1.96	
3	methyl acetate	902	nd	A, B	4.36		3.12		0.01	
4	ethyl acetate	977	602	A, B	29.00	0.0000	23.89		2.38	
5	2-butanone <sup>d</sup>	1000	nd	B	5.00	0.0006	6.36		0.89	
6	3-methylbutanal	1005	629	A, B					0.66	
7	ethanol	1010	668	A,B	48.24	0.0000	15.11		7.31	
8	ethyl propanoate	1021	nd	A,B			1.23			
9	propyl acetate	1030	nd	A,B			1.21		0.01	
10	pentanal <sup>d</sup>	1034	732	B	3.77		2.16		2.30	
11	2-methylpropanol <sup>d</sup>	1043	797	B	3.58		0.72		1.81	
12	methyl 2-methylbutanoate <sup>d</sup>	1052	776	B					1.24	0.0194
13	ethyl butanoate	1069	804	A, B	1.26		0.48	0.0475	0.22	
14	methylbenzene <sup>d</sup>	1073	674	B	2.06		1.54		1.31	
15	ethyl 2-methylbutanoate <sup>d</sup>	1083	849	B					1.07	
16	ethyl 3-methylbutanoate	1096	nd	A,B			0.54			
17	2-hexen-4-one <sup>d</sup>	1099	685	B					0.61	
18	butyl acetate	1100	710	A,B			0.57		1.36	
19	hexanal	1105	700	A, B	4.94		1.46	0.0328	14.01	
20	1-butanol	1116	nd	A, B			0.29			
21	3-methylbutyl acetate	1139	911	A, B			0.58		0.54	
22	1,2-dimethylbenzene	1159	753	A, B	0.26		0.15		0.41	
23	3-pentenol	1177	809	A, B					0.25	
24	pentyl acetate <sup>d</sup>	1193	nd	B			1.07		0.01	
25	isocineole <sup>d</sup>	1199	1008	B	0.01		1.27			
26	1-heptanal <sup>d</sup>	1206	872	B					0.89	
27	pentyl propanoate <sup>d</sup>	1208	nd	B			0.42	0.0175		
28	limonene	1213	1021	A, B	1.26		0.92	0.0187	0.81	0.0054
29	eucalyptol <sup>d</sup>	1222	1023	B	1.07		0.38			
30	butyl butanoate <sup>d</sup>	1232	nd	B					0.04	
31	( <i>E</i> )-2-hexenal	1234	854	A, B	1.28		0.31	0.0007	0.62	
32	ethyl hexanoate	1245	994	A, B	0.55		0.27	0.0170	0.01	
33	pseudocumene <sup>d</sup>	1252	961	B	1.10		1.76		0.86	
34	pentanol <sup>d</sup>	1261	764	B	0.19		0.22		0.36	
35	3-octanone <sup>d</sup>	1266	896	B					0.04	
36	<i>p</i> -cymene <sup>d</sup>	1275	1017	B	0.24		0.14			
37	hexyl acetate	1282	1008	A, B	0.10		0.24		0.54	
38	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimene <sup>d</sup>	1286	1031	B	0.30					
39	3-hydroxy-2-butanone <sup>d</sup>	1290	nd	B	1.15	0.0043	0.26	0.0189	0.10	
40	1-octanal <sup>d</sup>	1299	1006	B					0.09	
41	( <i>E</i> )-isolimonene <sup>d</sup>	1306	nd	B	0.16					
42	3-octenone <sup>d</sup>	1310	979	B					0.43	
43	3-hexenyl acetate <sup>d</sup>	1321	1009	B			0.10		0.10	
44	( <i>Z</i> )-2-octenal <sup>d</sup>	1329	1049	B					1.21	0.0244
45	2-hexenyl acetate <sup>d</sup>	1338	nd	B			0.06			
46	6-methyl-5-hepten-2-one	1340	980	A, B	0.36	0.0194	0.16		2.52	0.0267
47	1-hexanol	1356	858	A, B	0.64		1.07		4.44	
48	ethyl 4-hexanoate <sup>d</sup>	1365	nd	B					0.12	
49	( <i>Z</i> )-3-hexenol	1382	nd	A,B			0.06		0.33	
50	fenchone	1385	nd	A,B			0.09			
51	ethyl 2-methyloctanoate <sup>d</sup>	1388	1156	B	0.34		0.21		0.33	
52	1-nonanal <sup>d</sup>	1394	1098	B			0.20		0.26	0.0296
53	citronellal <sup>d</sup>	1398	1145	B					0.52	0.0043
54	( <i>E</i> )-2-hexenol	1403	nd	A, B	0.26	0.0036	0.56	0.0001	0.06	
55	butyl hexanoate <sup>d</sup>	1412	nd	B					0.02	
56	hexyl butanoate <sup>d</sup>	1414	nd	B					0.03	
57	2-octanol	1420	1004	A,B			0.01		0.03	0.0334
58	( <i>E</i> )-2-octenal <sup>d</sup>	1425	1060	B					1.24	
59	ethyl octanoate	1431	1191	A, B	0.62	0.0337	0.48	0.0126	0.33	
60	megastigme-7( <i>E</i> )-9,13-triene <sup>d</sup>	1439	1350	B	0.45					
61	acetic acid	1443	606	A, B	3.52		0.86		0.78	
62	3-octenol <sup>d</sup>	1447	972	B	0.68		0.25		1.24	
63	2-furancarboxyaldehyde	1454	817	A, B	0.39				0.26	
64	nerol oxide <sup>d</sup>	1460	1147	B			0.01		0.31	0.0406
65	1,2,3,4-tetrahydro-1,5,7-trimethylnaphthalene <sup>d</sup>	1462	1242	B	0.57		0.01			
66	octyl acetate	1469	1149	A, B			0.20		0.03	
67	benzaldehyde	1504	953	A, B	75.31		35.80	0.0001	0.30	
68	theaspirane B <sup>d</sup>	1523	1286	B	5.59	0.0010	0.29			
69	( <i>E</i> )-2-nonenal	1524	1162	A, B	1.86	0.0040			0.90	
70	ethyl nonanoate	1530	1288	A, B	5.98		1.18		2.62	
71	linalool	1544	1093	A,B	44.69	0.0004	2.19	0.0025	1.67	
72	1-octanol	1553	1064	A, B	1.37		1.02	0.0331	2.39	

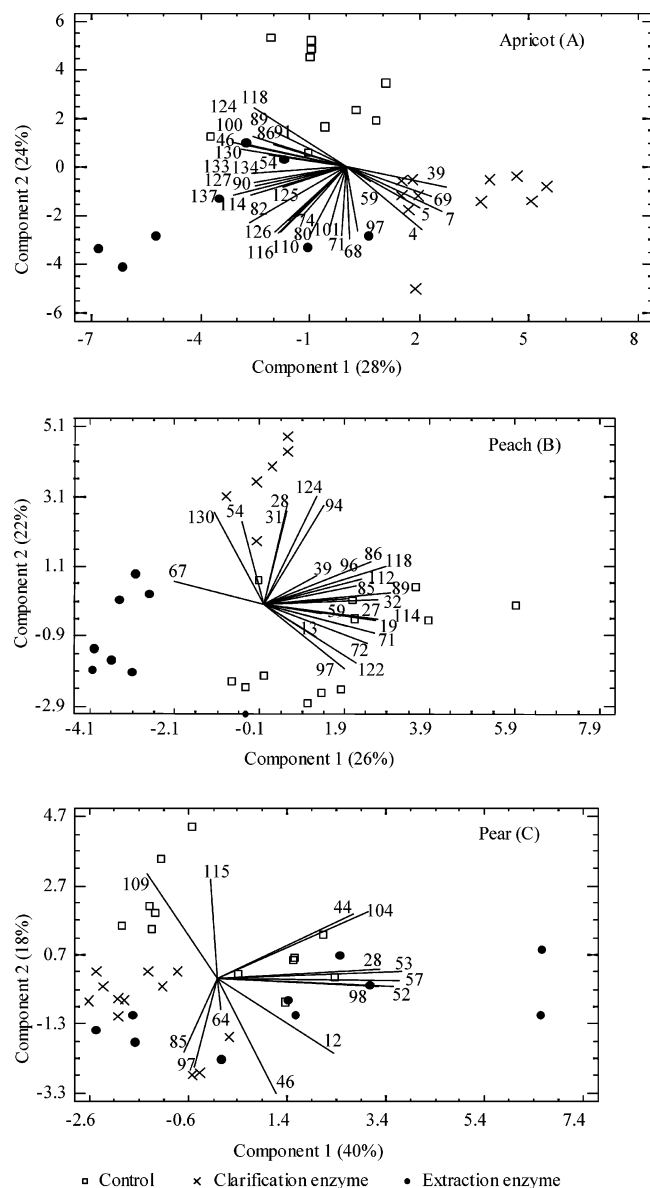
Table 2. (Continued)

	KI CW phase <sup>a</sup>	KI HP5 phase <sup>b</sup>	ID <sup>c</sup>	apricot (n = 18)	enzyme factor <sup>d</sup>	peach (n = 18)	enzyme factor	pear (n = 18)	enzyme factor
73	5-methylfurfural <sup>d</sup>	1562	nd	B	0.32				
74	megastigme-4,6(E),8(E)-triene <sup>d</sup>	1568	1329	B	4.67	0.0007			
75	isobornyl acetate	1568	1275	A,B			1.31	0.76	
76	$\alpha$ -fenchyl alcohol <sup>d</sup>	1572	1276	B			2.35	0.01	
77	$\alpha$ -isophoron <sup>d</sup>	1576	1051	B	0.21		0.36		
78	2,6-nonadienal <sup>d</sup>	1577	1155	B				1.52	
79	4-terpineol <sup>d</sup>	1591	nd	B			1.13		
80	megastigme-4,6(E),8(Z)-triene <sup>d</sup>	1598	1317	B	4.18	0.0021			
81	$\beta$ -ciclocytral <sup>d</sup>	1603	1210	B	3.17		0.87	0.81	
82	megastigme-4,6(Z),8(Z)-triene <sup>d</sup>	1606	1251	B	20.50	0.0000			
83	hexyl hexanoate <sup>d</sup>	1608	nd	B				2.54	
84	2-decenol <sup>d</sup>	1612	nd	B				4.51	
85	butanoic acid	1620	820	A,B			0.70	0.0038	0.0063
86	menthol <sup>d</sup>	1632	1171	B	1.63	0.0455	1.65	0.0005	1.23
87	ethyl decanoate	1635	1386	A,B	5.25		3.15		
88	(E)-2-decenal <sup>d</sup>	1638	nd	B				7.20	
89	unknown 1646 m/z 73, 147, 207	1646	nd	B	3.10	0.0173	1.29	0.0071	
90	ethyl benzoate <sup>d</sup>	1651	1162	B	12.07	0.0012			
91	1,2,3,4-tetrahydro-1,5,8-trimethylnaphthalene <sup>d</sup>	1655	1200	B	6.15	0.0001			
92	2-decanol	1657	nd	A,B	1.14				
93	3-nonanol	1658	nd	A,B			1.02	2.76	
94	heptanoic acid	1662	nd	A,B			0.42	0.0008	
95	unknown 1671 m/z 74, 121, 161	1671	nd	B				0.01	
96	$\gamma$ -hexalactone <sup>d</sup>	1683	1047	B	0.60		4.61	0.0394	
97	$\alpha$ -terpineol	1689	1181	A, B	3.73	0.0013	0.79	0.0138	0.46
98	(Z)-2,(Z)-4-decadienal <sup>d</sup>	1696	nd	B				2.16	0.0007
99	$\alpha$ -muurolene <sup>d</sup>	1711	nd	B				0.01	
100	naphthalene <sup>d</sup>	1719	1170	B	1.20	0.0063			
101	1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene <sup>d</sup>	1724	1340	B	4.26	0.0050	0.55		
102	(Z,E)- $\alpha$ -farnesene	1725	nd	A, B				1.25	
103	$\delta$ -cadinene <sup>d</sup>	1744	1548	B				0.42	
104	(E,E)- $\alpha$ -farnesene	1747	nd	A, B				7.78	0.0059
105	2,4-decadienal <sup>d</sup>	1762	1208	B				1.19	
106	1-decanol	1763	1269	A,B			0.22	0.26	
107	2-phenylethyl acetate	1777	1260	A, B			0.01	0.29	
108	$\gamma$ -heptalactone <sup>d</sup>	1789	1248	B			0.01		
109	methyl (E)-2,(Z)-4-decadienoate <sup>d</sup>	1794	1386	B				1.13	0.0461
110	nerol	1797	1251	A, B	0.96	0.0000			
111	(E)-2,(E)-4-decadienal <sup>d</sup>	1809	1305	B				0.47	
112	$\beta$ -damascenone <sup>d</sup>	1810	1386	B			0.58	0.0373	0.80
113	ethyl (E)-2,(E)-4-decadienoate <sup>d</sup>	1842	1445	B				0.01	
114	hexanoic acid	1843	1019	A, B	1.09	0.0298	0.47	0.0321	
115	ethyl (E)-2,(Z)-4-decadienoate <sup>d</sup>	1845	1457	B				7.13	0.0123
116	geraniol	1848	1246	A, B	2.70	0.0227			
117	ethyl dodecanoate	1848	1598	A, B			0.58	0.01	
118	geranyl acetone <sup>d</sup>	1853	1441	B	2.94	0.0000	1.12	0.0264	2.93
119	ethyl (Z)-2,(E)-4-decadienoate <sup>d</sup>	1859	nd	B				0.01	
120	2-phenylethanol	1902	1118	A, B	0.39		0.25		
121	$\alpha$ -calacorene <sup>d</sup>	1904	1525	B				0.77	
122	$\gamma$ -octalactone <sup>d</sup>	1906	1259	B			0.33	0.0004	
123	ethyl (Z)-2,(E)-6-dodecadienoate <sup>d</sup>	1917	nd	B				0.01	
124	$\beta$ -ionone	1931	1472	A, B	4.26	0.0014	1.41	0.0367	1.32
125	dihydro- $\beta$ -ionone <sup>d</sup>	1952	1405	B	5.94	0.0006			
126	dihydro- $\beta$ -ionol <sup>d</sup>	1966	nd	B	1.66	0.0306			
127	4,5-dimethylfurfural <sup>d</sup>	1978	nd	B	3.79	0.0071			
128	1,8-dimethylnaphthalene <sup>d</sup>	1989	1404	B				0.52	
129	methyl eugenol <sup>d</sup>	2016	nd	B				0.30	
130	cinnamaldehyde	2039	1258	A, B	1.91	0.0002	1.63	0.0052	2.76
131	$\gamma$ -nonalactone	2055	1366	A, B	0.26		0.33		
132	octanoic acid	2068	1279	A, B				0.53	
133	ethyl cinnamate <sup>d</sup>	2129	1451	B	0.94	0.0212			
134	$\gamma$ -decalactone	2142	1454	A, B	0.78	0.0046	3.03	0.01	
135	eugenol <sup>d</sup>	2164	1346	B			0.41		
136	decanoic acid	2175	1357	A, B	0.52			0.69	
137	unknown 2258 m/z 73, 101, 144	2258	1133	B	19.10	0.0243	4.63	0.01	
138	$\delta$ -dodecalactone <sup>d</sup>	2467	1677	B	0.98				

<sup>a</sup> Carbowax phase. <sup>b</sup> HP5 phase. <sup>c</sup> Identification (A, comparison of retention time with reference standards; B, mass spectrometry). <sup>d</sup> Tentatively identified. <sup>e</sup> Not detected. <sup>f</sup> mg/L equivalents of internal standard. <sup>g</sup> Significance value obtained by enzyme factor (*p*).

These compounds can be formed as a result of in vivo degradation or thermal degradation generated during the processing of foods containing carotenoids (28).

In pear fruit the volatile composition was mainly composed by oxygenated compounds (such as aldehydes, alcohols, and ketones) and esters, as was described previously in the literature



**Figure 2.** PCA of volatile compounds (significant by one-way ANOVA) according to the enzymatic treatment realized in apricot (A), peach (B), and pear (C).

(14–16, 34, 35). In the current study (Table 2) hexanal, cinnamaldehyde, methyl and ethyl decadienoates, and farnesenes were clearly detected. Ethyl esters of 2,4-decadienoic acids were the impact character compounds responsible for pleasant pear-like odor (14, 16); also,  $\alpha$ -farnesenes were found as a relatively major components (11).

#### Effect of Enzymatic Treatment on Volatile Composition.

The differences observed with the enzymatic treatment affect only quantitatively the volatile compounds. Figure 2 shows the PCA performed with the volatile compounds that were statistically significantly affected by the enzyme treatment (Table 2). The multifactor ANOVA results indicate that the effect of enzymatic treatment depends on the fruit variety or lot (data not shown).

In Figure 2A can be observed apricot juices PCA. Samples were grouped according to the enzyme used in elaboration. Component 1 separates the samples obtained with the two enzymes used in this study, whereas component 2 separates control samples and the juices obtained with enzymes. Control samples were the poorest in volatile compounds, mainly

terpenoids and norisoprenoids with pleasant odor: megastigme-4,6(*E*)-8(*E*)-triene, megastigme-4,6(*E*)-8(*Z*)-triene, megastigme-4,6(*Z*)-8(*Z*)-triene, 1,2-dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1,5,8-trimethylnaphthalene,  $\alpha$ -terpineol, nerol, the-aspirane B, geraniol, dihydro- $\beta$ -ionol, and linalool (with an increase of 50% mainly in the samples treated with extraction enzyme) (Figure 2A; Table 2). This could be due to an enzyme effect over soluble polysaccharide composition. According to the literature, pectins could affect the flavor release in different ways: the viscosity caused by pectins (36) and the binding of the aroma compounds with the food matrix (37) could cause a decrease in flavor release. The value of total and acid polysaccharides and the polysaccharide fractions of  $M_r$  100–85, 45–30, 17–13, and 1.7–1.3 kDa were higher in apricot control juices (Table 1), which could cause a retention of volatile compounds and thus a decrease of these compounds in the headspace. Another possibility for the minor content of varietal compounds in control samples could be the glycosidic activity in enzyme preparations. This activity could hydrolyze glycosidic precursors, releasing free terpenes and norisoprenoids of its aglycons (Table 1;  $M_r < 1000$ ), so varietal substances could be enhanced. Juices treated with clarification enzyme could present higher amounts of ethyl acetate, 2-butanone, ethanol, 3-hydroxy-2-butanone, and (*E*)-2-nonenal than extraction enzyme samples.

The PCA performed with peach (Figure 2B; Table 2) showed that several volatile compounds were separated according to the enzymatic treatment. Samples treated with extraction enzyme had significantly lesser amounts of hexanal, pentyl propanoate, ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, 1-octanol, linalool,  $\alpha$ -terpineol, menthol, hexanoic acid, geranyl acetone, and lactones  $\gamma$ -hexalactone and  $\gamma$ -octalactone. Lactones  $\gamma$ -octalactone (detected in only the Royal Glory variety) and  $\gamma$ -hexalactone, described in the literature as responsible for peach flavor (1, 5–7, 9, 13), decreased 63 and 43%, respectively, in extraction samples. Only benzaldehyde seems to increase with the extraction enzyme, whereas the contents of limonene, heptanoic acid, and  $\beta$ -ionone were increased with the clarification enzyme. In Table 1 can be observed that in the extraction enzyme treated samples, the yield value, total and acid polysaccharides, and polysaccharides of  $M_r$  540–440 and 320–215 kDa were higher. However, in this case the treatment with extraction enzyme did not increase the varietal volatile compounds.

For pear juices (Figure 2C; Table 2) control samples have a volatile composition different from that of the enzyme-treated samples. Clarification enzyme juices were poorest in (*Z*)-2, (*Z*)-4-decadienal, limonene, citronellal, 2-octanol, 1-nonanal, (*Z*)-2-octenal, and (*E,E*)- $\alpha$ -farnesene. Control samples of variety Conference had higher amounts of methyl (*E*)-2, (*Z*)-4-decadienoate, and ethyl (*E*)-2, (*Z*)-4-decadienoate, the impact character compounds in pear. The clarification enzyme used in the current study for pear has not been the most appropriate one due to its negative effects on the amount of decadienoate esters.

These preliminary results indicate that various volatile compounds could be affected by the applied procedure even if more specific studies are required to increase this knowledge. In conclusion, the data obtained show that the use of enzymes during the elaboration of fruit juice affects the volatile composition with different behaviors on the studied fruits. In the case of apricot, the enzymes used enhanced the flavor in pleasant odors such as terpenes and norisoprenoids. Peaches treated with extraction enzyme were the poorest in volatile compounds, probably because the high polysaccharide content in these samples could cause a higher retention of volatile compounds.



Finally, in pear fruit the enzymatic treatment used did not favor the content of decadienoate esters, the impact character compound of pears.

#### LITERATURE CITED

- (1) Derail, C.; Hofmann, T.; Schieberle, P. Differences in key odorants of handmade juice of yellow-flesh peaches (*Prunus persica* L.) induced by the workup procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4742–4745.
- (2) Versari, A.; Castellari, M.; Parpinello, G. P.; Riponi, C.; Galassi, S. Characterisation of peach juices obtained from cultivars Redhaven, Suncrest and Maria Marta grown in Italy. *Food Chem.* **2002**, *76*, 181–185.
- (3) Azondanlou, R.; Darbellay, C.; Luisier, J.-L.; Villettaz, J.-C.; Amadò, R. Development of a model for quality assessment of tomatoes and apricots. *Lebensm.-Wiss. -Technol.* **2003**, *36*, 223–233.
- (4) Riu-Aumatell, M.; Castellari, M.; López-Tamames, E.; Galassi, S.; Buxaderas, S. Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chem.* **2004**, *87*, 627–637.
- (5) Visai, C.; Vanoli, M. Volatile compound production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Sci. Hortic.* **1997**, *70*, 15–24.
- (6) Chapman, G. W.; Horvat, R. J. Changes in nonvolatile acids, sugars, pectin and sugar composition of pectin during peach (Cv. Monroe) maturation. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 383–387.
- (7) Robertson, J. A.; Meredith, F. I.; Horvat, R. J.; Senter, S. D. Effect of cold storage and maturity on the physical and chemical characteristics and volatile constituents of peaches (Cv. Cresthaven). *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 620–624.
- (8) Chapman, G. W.; Horvat, R. J.; Forbus, W. R. Physical and chemical changes during the maturation of peaches (Cv. Majestic). *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 867–870.
- (9) Aubert, C.; Gunata, Z.; Ambid, C.; Baumes, R. Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of yellow- and white-fleshed nectarines during maturation and artificial ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3083–3091.
- (10) Gomez, E.; Ledbetter, C. A. Development of volatile compounds during fruit maturation: characterization of apricot and plum × apricot hybrids. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *74*, 541–546.
- (11) Shiota, H. Changes in the volatile composition of La France pear during maturation. *J. Sci. Food Agric.* **1990**, *52*, 421–429.
- (12) Lalel, H. J. D.; Singh, Z.; Tan, S. C. Aroma volatiles production during fruit ripening of “Kensington” Pride mango. *Postharvest Biol. Technol.* **2003**, *27*, 323–336.
- (13) Sumitani, H.; Suekane, S.; Nakatani, A.; Tatsuka, K. Changes in composition of volatile compounds in high-pressure treated peach. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 785–790.
- (14) Kralj-Cigic, I.; Zupancic-Kralj, L. Changes in odour of Bartlett pear brandy influenced by sunlight irradiation. *Chemosphere* **1999**, *38*, 1299–1303.
- (15) Lara, I.; Miró, R. M.; Fuentes, T.; Sayez, G.; Graell, J.; López, M. L. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biol. Technol.* **2003**, *29*, 29–39.
- (16) Chervin, C.; Speirs, J.; Loveys, B.; Patterson, B. D. Influence of low oxygen storage on aroma compounds of whole pears and crushed pear flesh. *Postharvest Biol. Technol.* **2000**, *19*, 279–285.
- (17) Lambert, Y.; Demazeau, G.; Lagerteau, A.; Bouvier, J.-M. Changes in aromatic composition of strawberry after high-pressure treatment. *Food Chem.* **1999**, *67*, 7–16.
- (18) Bezman, Y.; Mayer, F.; Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Ben-Oliel, G.; Rabinowitch, H. D.; Naim, M. Differential effects of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) matrix on the volatility of important aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 722–726.
- (19) Council Directive 2001/112/EC of December 20, 2001, relating to fruit juices and certain similar products intended for human consumption.
- (20) Lao, C.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S.; De la Torre-Boronat, M. C. Grape pectic enzyme treatment effect on white musts and wines composition. *J. Food Sci.* **1996**, *61*, 553–556.
- (21) Lao, C.; López-Tamames, E.; Lamuela-Raventós, R. M.; Buxaderas, S.; De la Torre-Boronat, M. C. Pectic enzyme treatment effects on quality of white grape musts and wines. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 1142–1149.
- (22) General standard for fruit juices preserved exclusively by physical means not covered by individual standards. Codex Stan 164-1989, Roma, Italy, 1989.
- (23) Boehringer-Mannheim, GmbH, Biochemica, Germany, 1992.
- (24) Segarra, I.; Lao, C.; López-Tamames, E.; de la Torre-Boronat, M. C. Spectrophotometric method for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 564–570.
- (25) López-Barajas, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Improved size-exclusion high performance liquid chromatographic method for the simple analysis of grape juice and wine polysaccharides. *J. Chromatogr. A* **1998**, *823*, 339–347.
- (26) Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Volatile compounds of red and white wines by headspace solid-phase microextraction using different fibers. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 310–316.
- (27) Tat, L.; Comuzzo, P.; Stolfo, I.; Battistutta, F. Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Food Chem.* **2005**, *93*, 361–369.
- (28) Mahattanatawee, K.; Rouseff, R.; Valim, F. M.; Naim, M. Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 393–397.
- (29) *Statgraphics 5.1* (1994–2000); Statistical Graphics Corp.: Rockville, MD.
- (30) Guichard, E. Quantification of some volatile aromatic compounds of apricot by adding standards. *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 1902–1904.
- (31) Guichard, E.; Souty, M. Comparison of the relative quantities of aroma compounds found in fresh apricot (*Prunus armeniaca*) from six different varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 301–307.
- (32) Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 471–477.
- (33) Narain, N.; Hsieh, T. C.-Y.; Johnson, C. E. Dynamic headspace concentration and gas chromatography of volatile flavor components in peach. *J. Food Sci.* **1990**, *55*, 1303–1307.
- (34) Suwanagul, A.; Richardson, D. G. Pear fruit volatiles characterized by SPME and capillary GLC/mass spectroscopy. *Acta Hortic.* **1998**, *475*, 599–603.
- (35) Suwanagul, A.; Richardson, D. G. Identification of headspace volatile compounds from different pear (*Pyrus communis* L.) varieties. *Acta Hortic.* **1998**, *475*, 605–623.
- (36) Roberts, D. D.; Elmore, S.; Langely, K. R.; Bakker, J. Effect of sucrose, guar gum and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavor compounds under dynamic conditions. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1321–1326.
- (37) Hansson, A.; Andersson, J.; Leufvén, A. The effect of sugars and pectin on flavor release from a soft drink-related model system. *Food Chem.* **2001**, *72*, 363–368.

---

Received for review June 13, 2005. Revised manuscript received July 26, 2005. Accepted July 31, 2005. This study was made possible thanks to financial assistance from the Generalitat de Catalunya (Spain), Project 2001SGR-00131; from the Ministerio de Educación y Cultura (MEC) (Spain), Project HI1999-0121; and from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (Spain), Project VIN01-051.

## 5 Comentarios a los resultados

## 5 Comentarios a los resultados

En este capítulo se pretende dar una visión global e integradora de los resultados obtenidos y destacar aquéllos que se consideran más relevantes. También se mencionan otros resultados no tratados en los capítulos anteriores, porque no atienden directamente a los objetivos y las hipótesis de trabajo propuestas, pero son observaciones de interés que se derivan del plan de trabajo aplicado y que, indirectamente, están relacionadas con los objetivos de esta memoria.

### 5.1 PRIMERA PARTE: Caracterización de compuestos volátiles en bebidas derivadas de fruta por HS/SPME

La calidad de un producto incluye entre otros la textura, el gusto o el olor. La gran dificultad de la industria para encontrar materias primas aromáticamente estandarizadas convierten en indispensable el disponer de un método de determinación que sirva, a la vez, para identificar y cuantificar los compuestos volátiles. Los métodos de determinación de aromas se componen de dos partes: la extracción de los compuestos aromáticos y la detección e identificación por cromatografía de gases. El punto crítico y diferenciador de unos y otros métodos, es la técnica que se utiliza para extraer los compuestos. Suelen ser métodos largos, con múltiples etapas en las cuales fácilmente se puede producir pérdida de analitos o la formación de artefactos y además, suelen utilizar volúmenes considerables de disolventes, lo que los convierte en métodos caros y poco respetuosos con el medio ambiente. Estos inconvenientes los define como métodos lentos que difícilmente podrán aplicarse para el control rutinario en las empresas de derivados de fruta. La microextracción en fase sólida (SPME) solventa muchos de estos problemas, es rápido (en menos de 2 horas ya se obtiene el perfil cromatográfico), la preparación de la

muestra es sencilla, es de bajo coste y ecológico, ya que no requiere de disolventes orgánicos. Las ventajas que ofrece esta técnica han sido decisivas para comprobar su utilidad como método para la caracterización de volátiles en distintos tipos de bebidas alcohólicas y analcohólicas.

### 5.1.1 Bebidas analcohólicas

Para la caracterización de aromas en zumos y néctares de fruta comerciales el método de HS/SPME ha resultado satisfactorio ya que se ha obtenido un amplio perfil para los tres tipos de fruta estudiados: 37 compuestos en las muestras de albaricoque, 60 en melocotón y 49 en pera, pertenecientes a una extensa variedad de familias químicas. A pesar de esto, sólo unos pocos compuestos son comunes a todas las muestras comerciales de una misma fruta: 10 en las de albaricoque, sólo la  $\gamma$ -decalactona se encuentra en las 17 muestras de melocotón y 2 compuestos en las muestras de pera (acetato de hexilo y E2,Z4-decadienoato de etilo). Esta gran variabilidad puede ser debida a la heterogeneidad de las muestras comerciales, a causa de que se han utilizado diferentes variedades de la fruta, por el sistema de elaboración empleado y por el tipo de formulación utilizado en la preparación.

Dado el amplio intervalo de grados Brix (entre 5.8 y 16.2) obtenido para un mismo tipo de fruta, probablemente a causa de diferencias varietales, se creyó conveniente comprobar si el contenido de azúcar afectaba a la extracción por SPME. Teniendo en cuenta que el método de SPME se ha utilizado en la modalidad de espacio de cabeza (HS/SPME), para intentar normalizar la extracción de los volátiles y disminuir causas de variabilidad, las muestras se diluyeron al 75, 50 y 25 % con agua destilada. Posteriormente, se obtuvo el perfil cromatográfico y los ° Brix resultantes. Como se muestra en la Figura 5.1, para la mayoría de los compuestos no se observó

disminución significativa del área cromatográfica al diluir el zumo, con lo cual puede concluirse que el área de los compuestos volátiles no depende del contenido en sólidos solubles. Las pequeñas variaciones que se observan en la Figura 5.1 pueden estar relacionadas con interacciones entre compuestos volátiles y otros compuestos de bajo peso molecular que afectarán a la capacidad extractiva del SPME. Por esta razón, se decidió realizar todas las determinaciones con la muestra sin diluir.

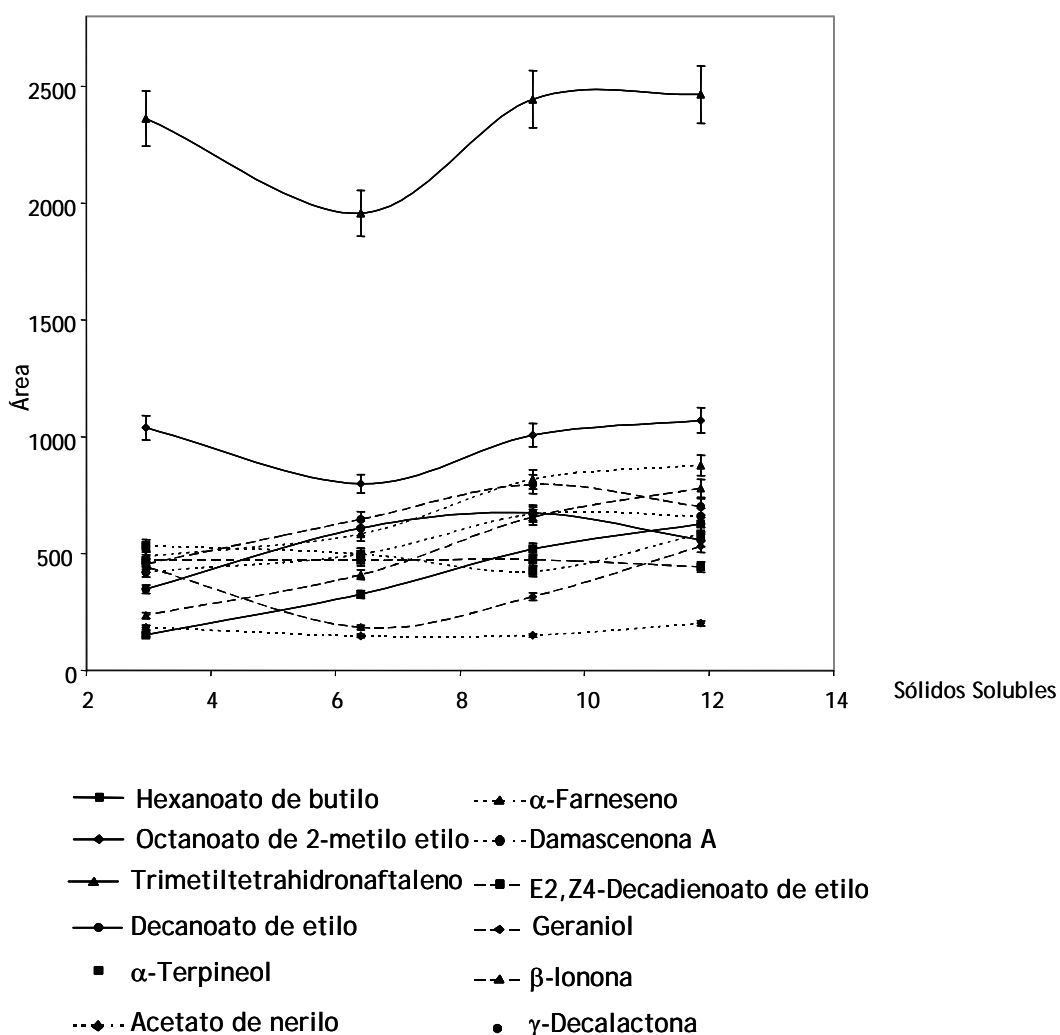
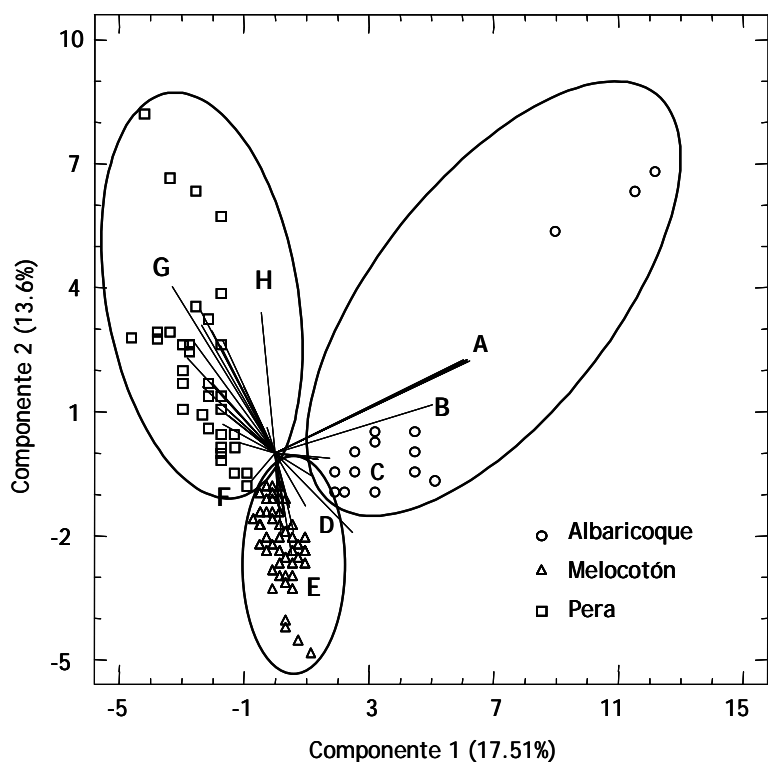


Figura 5.1: Áreas obtenidas en función de los grados Brix en algunos de los compuestos volátiles representativos para los zumos estudiados.

Se ha comprobado la fiabilidad del método mediante el cálculo de la linealidad, los límites de detección y cuantificación de algunos patrones de distintas familias químicas, así como los factores de respuesta absolutos (apartado 4.1.1). Los resultados obtenidos explican por qué, a pesar del gran rango de familias químicas

obtenidas, prácticamente no se han identificado alcoholes y aldehídos  $C_6$ , ya que éstos presentan unos factores de respuesta muy bajos. Probablemente la elevada polaridad de estos compuestos dificulta su extracción debido al carácter apolar de la fibra PDMS utilizada. La utilidad del método SPME se ilustra en la Figura 5.2, obtenida mediante análisis de componentes principales, dónde se observa una buena separación para las tres frutas estudiadas, en función de los compuestos volátiles más representativos para cada fruta.



A:  $\alpha$ -terpinoleno; desconocido IK 1505; desconocido IK 1511; desconocido IK 1568; megastigma-4,6,8-trieno; desconocido IK 1836

B: isovalerato de hexilo

C:  $\alpha$ -terpineol;  $\beta$ -ocimeno; vitispirano

D: desconocido IK 1465; 1,2,3,4-tetrahidro-1,1,6-trimetilnaftaleno

E: limoneno; linalool; cinamaldehído;  $\gamma$ -decalactona; 3,8,8-trimetiltetrahidronaftaleno; ácido acético;  $\beta$ -ionona

F: octanoato de etilo

G:  $\alpha$ (E,E)-farneseno; hexanol; butirato de hexilo; decanoato de etilo;  $\alpha$ (Z,E)-farneseno; dodecanoato de etilo; acetato de hexilo; hexanoato de hexilo; 4-decenoato de etilo; 2-decenoato de metilo; Z2,E4-decadienoato de metilo; E2,Z4-decadienoato de metilo;  $\beta$ -damascenona; anetol; desconocido IK 1820; E2,Z4-decadienoato de etilo; E2,E4-decadienoato de etilo; tetradecadienoato de metilo

H: desconocido IK 1869

**Figura 5.2:** Análisis de componentes principales realizado con los compuestos volátiles representativos para albaricoque, melocotón y pera.

Posteriormente se comprobó la capacidad discriminante del método de SPME aplicando el análisis multivariante discriminante de los principales compuestos volátiles (apartado 4.1.1), consiguiendo una buena separación según el tipo de fruta e igualmente cuando el análisis discriminante se aplica al tipo de producción de las muestras.

Si se estudian individualmente qué tipos de compuestos volátiles son significativos, en función del tipo de agricultura aplicada a las materias primas, los resultados son significativamente diferentes según la fruta. En la Tabla 5.1, 5.2 y 5.3 se puede observar la significación obtenida por el test de Kruskal-Wallis de los compuestos aromáticos en las frutas estudiadas entre la producción convencional y biológica. Los posibles marcadores de producción para la pera (Tabla 5.1) son mayoritariamente ésteres lo que coincide con su composición volátil característica (mayoritariamente compuesta por ésteres de etilo y acetato).

Compuestos volátiles	Pera		
	( <i>p</i> )	Convencional n=6	Biológico n=5
Acetato de hexilo	0.000	23	11
Acetato de 2-hexenilo	0.010	20	14
4-Decenoato de metilo	0.001	22	12
2-Decenoato de metilo	0.000	23	10
Acetato de geranilo	0.010	20	14
Isobutirato de geranilo	0.003	21	13
E2,Z4-Decadienoato de etilo	0.007	22	12
Z2,E6-Dodecadienoato de etilo	0.045	16	19

Tabla 5.1: Resultados obtenidos mediante el test de Kruskal-Wallis para pera.

Mientras que para melocotón son de tipo terpeno y para albaricoque es más diversificada, incluye algunos terpenos, aldehídos y lactonas (Tabla 5.2 y 5.3).

Compuestos volátiles	Melocotón		
	( <i>p</i> )	Convencional n=11	Biológico n=6
Acetato de 3-hexenilo	0.005	30	21
Octanoato de 2-metilo etilo	0.009	30	20
Isobutirato de 3-hexenilo	0.005	30	21
2-Hexanoato de etilo	0.015	25	29
Cariofileno	0.015	25	29
$\alpha$ (Z,E)-Farneseno	0.000	31	18
$\alpha$ -Terpineol	0.000	33	14
1,2,4a,5,8,8a-Hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)naftaleno	0.015	25	29
$\alpha$ (E,E)-Farneseno	0.011	30	19
Damascenona A	0.018	29	22
Geraniol	0.000	32	17
3-Hexenol	0.018	29	22
Benzaldehído	0.001	30	19
$\alpha$ -Ionona	0.015	25	29
$\gamma$ -Decalactona	0.005	30	21
$\gamma$ -Undecalactona	0.000	32	17

Tabla 5.2: Resultados obtenidos mediante el test de Kruskal-Wallis para melocotón.

En general, en pera y albaricoque los zumos convencionales presentan valores más elevados de los volátiles que han dado significativo en el test de Kruskal-Wallis, puede que los enzimas utilizados en la preparación comercial faciliten la liberación de algunos de estos compuestos, dando lugar a un zumo más rico en terpenos y ésteres, respectivamente. Así pues, el método convencional favorece la aparición de compuestos de un olor agradable y característico en las dos frutas. Por el contrario, en el melocotón los zumos elaborados según la agricultura biológica presentan valores superiores de los aromas significativos. Aunque los resultados obtenidos según el tipo de producción son preliminares, puesto que el número de muestras es



insuficiente para poder referirse a marcadores, si permiten considerar que algunos compuestos volátiles pueden ser indicadores de la tecnología utilizada y de la variedad o tipo de fruta.

Compuestos volátiles	Albaricoque		
	( <i>p</i> )	Convencional n=3	Biológico n=2
Isoamilbutirato	0.023	7	10
Decanoato de etilo	0.044	6	11
Limoneno	0.033	6	11
β-Ocimeno	0.033	6	11
α-Terpinoleno	0.023	7	10
Vitispirano	0.028	6	11
1,2,3,4-Tetrahydro- 1,1,6-trimetilnaftaleno	0.023	7	10
1-Hexanol	0.007	11	4
Desconocido IK 1465	0.001	11	4

**Tabla 5.3:** Resultados obtenidos mediante el Kruskal-Wallis test para albaricoque.

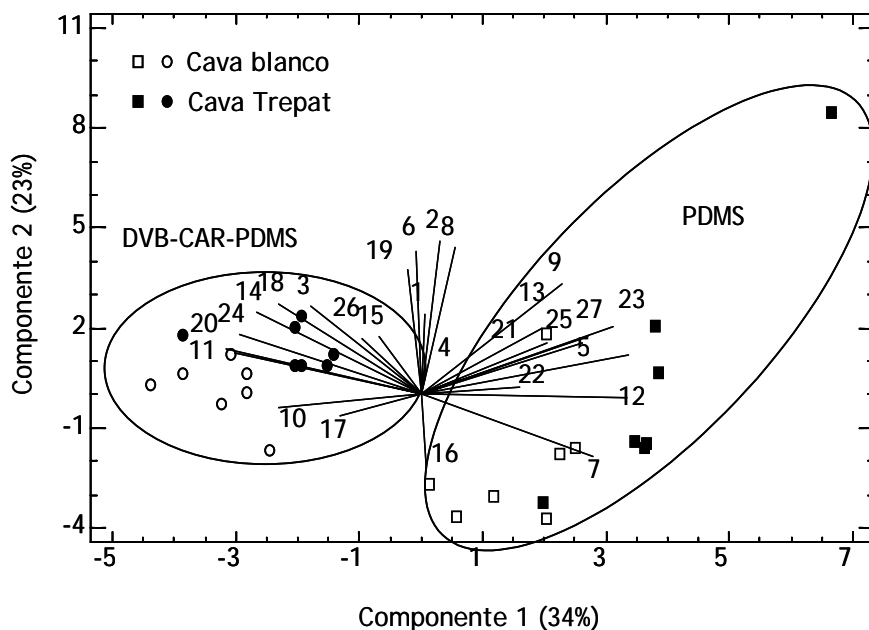
Por tanto puede considerarse que el método elegido ha demostrado ser efectivo para determinar un perfil volátil amplio en zumos de fruta detectando numerosas familias químicas, incluso algunos compuestos han sido identificados por primera vez en las frutas estudiadas como es el caso de algunos norisoprenoides de tipo naftaleno. Además, se han determinado algunos compuestos que podrían actuar como marcadores del tipo de producción utilizado.

### 5.1.2 Bebidas alcohólicas

Cuando el método de extracción de compuestos volátiles de SPME se aplica a bebidas alcohólicas los resultados obtenidos han sido igualmente satisfactorios. En esta parte de la tesis se ha estudiado mediante SPME, la composición y evolución de la fracción volátil durante el envejecimiento del cava en contacto con las levaduras,

como una medida más determinante y exigente de la capacidad discriminadora del método que la demostrada con los zumos de fruta. Se considera que el cava es un sistema dinámico que durante el tiempo que está en fase de rima en las bodegas (tiempo que según la legislación vigente debe ser mínimo de 9 meses) sufre una serie de cambios debidos probablemente a la presencia y autólisis de las levaduras. La caracterización de los compuestos volátiles durante la crianza podría ser muy útil para las bodegas elaboradoras, a fin de controlar la evolución del aroma a partir del tiraje, y poder seleccionar el momento óptimo de crianza del cava.

Para responder a estos objetivos se probaron dos recubrimientos poliméricos distintos para la extracción por SPME, la PDMS previamente utilizada y la fibra con triple recubrimiento Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Para realizar el seguimiento de la fracción volátil durante la crianza comprendida entre los 9 y 27 meses, se eligieron dos cavas de la misma bodega elaborados con distintas variedades de uva. Un cava comprendía las tres variedades blancas tradicionales (Macabeo, Xarel·lo y Parellada) y el otro era un cava rosado de la variedad Trepát. Las muestras se han tomado cada tres meses de crianza. Se han detectado 27 compuestos en el perfil volátil y las diferencias observadas según las variables tiempo de envejecimiento y fibra utilizada son únicamente de tipo cuantitativo. Cuando se realiza el análisis de componentes principales con todos los resultados según las dos variables (tiempo de crianza y tipo de fibra) se observa como la separación es fundamentalmente debida a la fibra utilizada [Componente 1 (34%)]. Mientras que el Componente 2 (23%) separa los dos cavas: el Trepát y el blanco.



**Figura 5.3:** Análisis de componentes principales (PCA) realizado con los compuestos volátiles de los cavas (los números de los vectores corresponden a la Tabla 1 de la publicación del apartado 4.1.2).

La determinación de la significación estadística por análisis de ANOVA demuestra que la fibra triple con propiedades extractivas más polares combinadas con un mecanismo de adsorción, favorece la extracción de compuestos polares como alcoholes, ácidos y aromas típicamente post-fermentativos o de crianza como vitispirano (compuesto número 10) y 1,2-dimetilo-1,1,6-trimetilnaftaleno (TDN) (17).

La interacción entre ambas variables (tiempo de crianza y tipo de fibra) obliga a realizar el PCA de los compuestos volátiles durante la evolución de la crianza con los valores obtenidos con cada fibra por separado. De este modo se observa que la discriminación por el tiempo de envejecimiento sólo se constata con la fibra triple. Las muestras de menor tiempo de envejecimiento (9-12 meses) se caracterizan por un mayor contenido en acetatos, y ésteres de etilo e isoamilo, mientras que vitispirano, TDN, hexanol, lactato de etilo y succinato de dietilo serian indicadores de cavas con largo envejecimiento. Estos resultados se confirman por análisis de

regresión donde se obtienen mayores resultados significativos con la fibra triple que con la PDMS (apartado 4.1.2).

De hecho se puede observar en las figuras siguientes como el vitispirano, TDN, y succinato de dietilo aumentan su contenido en función del tiempo de envejecimiento mientras que los acetatos de isoamilo, 2-feniletilo y hexilo disminuyen su contenido de forma significativa en función del tiempo.

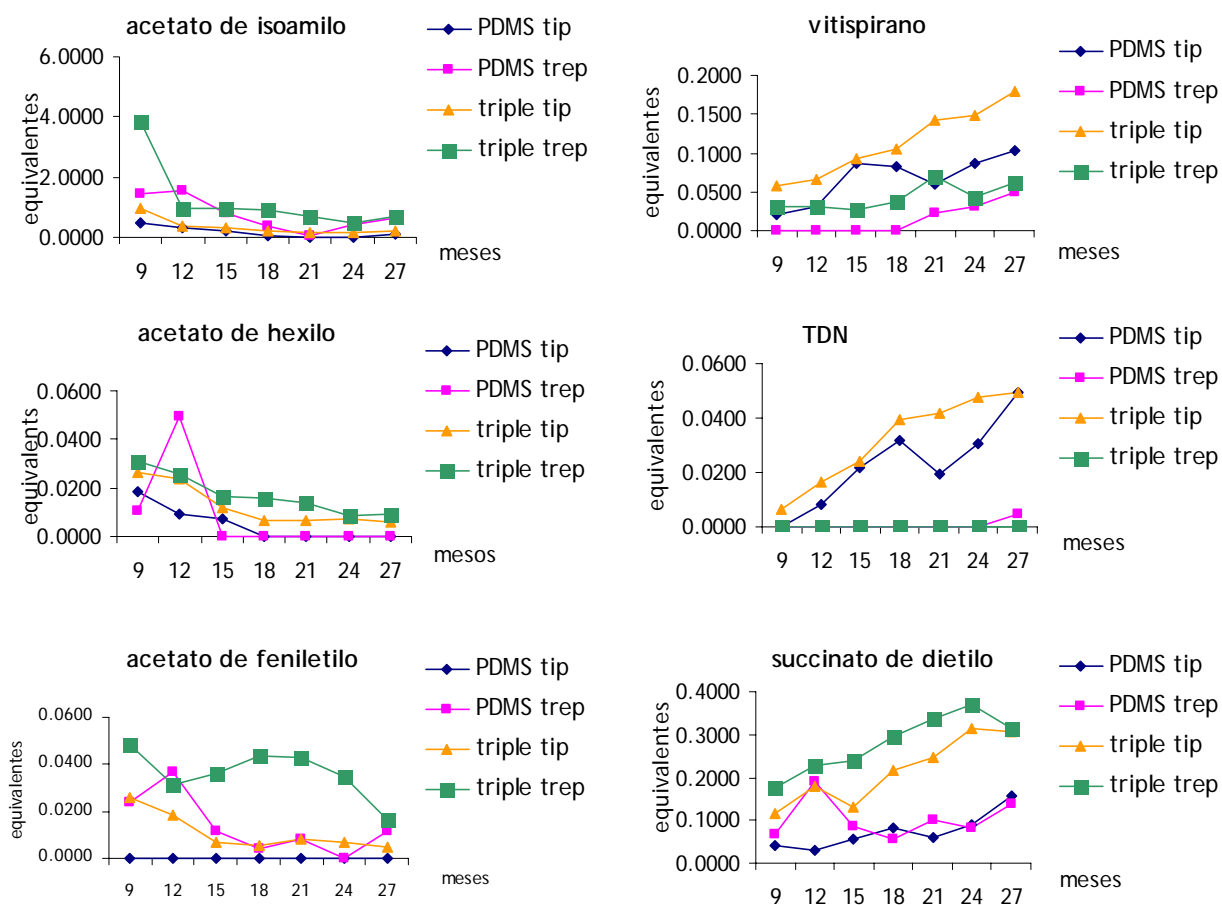


Figura 5.4: Evolución de los compuestos volátiles significativamente diferentes en función del tiempo de envejecimiento (tip: cava blanco; trep: cava trepat).

Se han calculado los factores de respuesta, los límites de detección y cuantificación y la linealidad para las dos fibras utilizadas en el estudio. La linealidad para la fibra triple es ligeramente superior a la PDMS para 13 de los 23 patrones utilizados. Mientras que los factores de respuesta relativos son o bien iguales o bien

superiores para la PDMS, excepto en el caso de succinato de dietilo, acetato de hexilo, hexanal, y ácido octanoico. Los valores de los límites de detección y cuantificación son también ligeramente superiores en la fibra triple que para la PDMS (Tabla 5.4 y Tabla 5.5).

Patrones	Intervalo de concentración (mg/L)	$r$	Factores de respuesta relativos	Límites detección	Límites cuantificación
Hexanoato de etilo	5-40	0.980	25	1.10	2.68
Octanoato de etilo	1-8	0.966	3	0.64	1.61
Nonanoato de etilo	0.5-2.3	0.978	1	5.76	16.34
Decanoato de etilo	0.1-2.0	0.941	2	1.44	3.74
Dodecanoato de etilo	0.5-4	0.996	0.4	1.77	4.94
Lactato de etilo	100-400	0.787	50000	0.38	0.99
Succinato de dietilo	100-500	0.999	400	1.37	3.66
Hexanoato de isoamilo	0.8-40	0.955	10	0.61	1.59
Octanoato de isoamilo	0.8-40	0.998	7	1.31	3.39
Acetato de isoamilo	25-200	0.901	200	10.92	33.37
Acetato de hexilo	10-70	0.999	25	0.71	1.74
Acetato de 2-feniletilo	10-70	0.993	100	1.92	5.28
Hexanol	62.5-500	0.959	2222	0.63	1.78
Cis-3-hexenol	62.5-500	0.954	5000	0.52	1.36
$\alpha$ -Terpineol	10-40	0.990	100	2.18	6.28
Geraniol	10-40	0.990	100	1.45	3.96
2-Feniletanol	31.25-250	0.968	5000	1.62	4.34
$\gamma$ -Butirolactona	80-400	0.999	400000	2.20	6.13
Nonalactona	10-80	0.996	286	2.60	7.42
$\gamma$ -Decalactona	10-80	0.990	100	3.01	8.52
Hexanal	18.75-300	0.999	667	13.91	39.62
Trans-2-hexenal	18.75-300	0.991	667	1.02	2.47
Ácido octanoico	18.75-150	0.984	40	2.44	6.73

Tabla 5.4: Linealidad, factores de respuesta relativos, y límites de detección y cuantificación obtenidos con la fibra PDMS.

Patrones	Intervalo de concentración (mg/L)	$r$	Factores de respuesta relativos	Límites de detección	Limites cuantificación
Hexanoato de etilo	5-40	0.996	25	1.25	3.81
Octanoato de etilo	0.5-8	0.985	2.5	2.09	6.25
Nonanoato de etilo	0.5-2.3	0.863	1	4.88	13.91
Decanoato de etilo	0.1-2.0	0.989	0.7	1.74	4.96
Dodecanoato de etilo	0.25-2.0	0.994	0.4	1.63	4.84
Lactato de etilo	100-400	0.979	5000	0.49	1.37
Succinato de dietilo	100-500	0.893	500	1.59	4.61
Hexanoato de isoamilo	0.8-40	0.969	10	2.03	6.25
Octanoato de isoamilo	0.8-40	0.993	5	1.27	3.58
Acetato de isoamilo	25-200	0.998	200	26.23	74.57
Acetato de hexilo	20-100	0.976	33	0.43	1.20
Acetato de 2-feniletilo	20-80	0.991	67	1.22	3.27
Hexanol	62.5-500	0.984	1000	0.54	1.55
Cis-3-hexenol	62.5-500	0.998	2000	0.82	2.36
$\alpha$ -Terpineol	10-40	0.999	25	1.74	5.04
Geraniol	10-40	0.990	22	2.01	5.98
2-Feniletanol	32.5-250	0.992	400	1.28	3.76
$\gamma$ -Butirolactona	80-400	0.983	6667	1.91	5.73
Nonalactona	10-80	0.974	40	2.32	6.97
$\gamma$ -Decalactona	10-80	0.992	33	2.86	8.73
Hexanal	18.75-150	0.996	1000	21.70	51.34
Trans-2-hexenal	18.75-150	0.999	500	0.31	0.76
Ácido octanoico	18.75-150	0.987	50	2.93	8.93

**Tabla 5.5:** Linealidad, factores de respuesta relativos, y límites de detección y cuantificación obtenidos con la fibra DVB/CAR/PDMS.

En definitiva, aunque las dos fibras utilizadas dan un perfil volátil cualitativamente similar, los resultados obtenidos con DVB/CAR/PDMS discriminan entre cavas que se diferencian por el tiempo de envejecimiento. Los compuestos volátiles muestran un comportamiento significativo en función del tiempo de crianza,

siendo los acetatos superiores en los cavas jóvenes y los aromas post-fermentativos como vitispirano, TDN y succinato de dietilo superiores en los cavas envejecidos.

## **5.2 SEGUNDA PARTE: Influencia de los polisacáridos sobre la composición volátil**

Para cumplir con el segundo objetivo de la tesis, previamente se debía disponer de un método para determinar los polisacáridos por masa molecular que sea suficientemente discriminante y a su vez rápido, y simple para ser usado en un número amplio de muestras. La principal dificultad de los métodos de determinación de polisacáridos es que, generalmente, son métodos largos y laboriosos por tanto muy poco útiles como análisis rutinarios. Además, cuando se separan los polisacáridos por peso molecular una dificultad añadida es la elección de los estándares más adecuados. Las escasas pectinas comerciales actualmente existentes en el mercado han provocado que se hayan tenido que utilizar otros estándares de diferente naturaleza química. En este estudio se han utilizado ácidos poliacrílicos ya que a pesar de no ser de naturaleza pectínica como los polisacáridos de las frutas o sus derivados, al ser compuestos con carga negativa presentarán un comportamiento cromatográfico similar a las pectinas. Este trabajo propone un método por cromatografía de gel permeación (GPC) y detección por índice de refracción (RI). El método de determinación de los polisacáridos se ha puesto a punto en mosto, la materia prima del vino a fin de observar la influencia de parámetros de vendimia en la calidad del mosto y del vino y, en zumos y néctares comerciales de distinto origen, convencional y biológico. En los dos casos, el método resulta suficientemente útil y discriminante dando lugar a resultados satisfactorios (apartados 4.2.1 y 4.2.2).

Finalmente, una vez comprobada la capacidad discriminante y eficacia de los dos métodos (HS/SPME y GPC) pudo abordarse el segundo objetivo de este trabajo, estudiar el efecto de los polisacáridos sobre la composición volátil. La gran

variabilidad observada en la composición en compuestos volátiles de los zumos y néctares comerciales, obligó a producir zumos en el laboratorio, a los cuales se les ha aplicado el mismo proceso para minimizar la variabilidad debida al modo de elaboración. De esta manera las únicas variables a considerar han sido la variedad o lote de cada fruta y el tratamiento pectolítico que se ha aplicado a las muestras. El tratamiento enzimático tiene por objeto modificar la composición en polisacáridos de la matriz y, observar si estos cambios afectan a los compuestos volátiles (apartado 4.2.3).

Se han podido identificar seis fracciones de polisacáridos en albaricoque y siete fracciones en melocotón y pera. En resumen los resultados obtenidos indican que el enzima de extracción incrementa el contenido de polisacáridos solubles totales mientras que los dos enzimas incrementan las fracciones de polisacáridos de menor masa molecular que provienen de los polisacáridos de peso molecular medio (100-85 y 45-30 Kda) que a su vez disminuyen.

Al mismo tiempo, en estas mismas muestras se ha realizado la caracterización aromática. Al utilizar la fibra triple Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) y así aumentar la polaridad del polímero extractivo, se ha facilitado la detección de los alcoholes y aldehídos de C<sub>6</sub>, que en el primer trabajo de zumos comerciales prácticamente no se detectaban (apartado 4.1.1). El perfil aromático encontrado en las frutas sin tratamiento enzimático, es decir, en las muestras control (apartado 4.2.3) ha sido amplio, detectando numerosas familias químicas (Figuras 5.5, 5.6, 5.7) e identificando por primera vez algunos norisoprenoides, teaspirano B (compuesto nº 68) y  $\alpha$ -isoforon (compuesto nº 77) en albaricoque y melocotón.



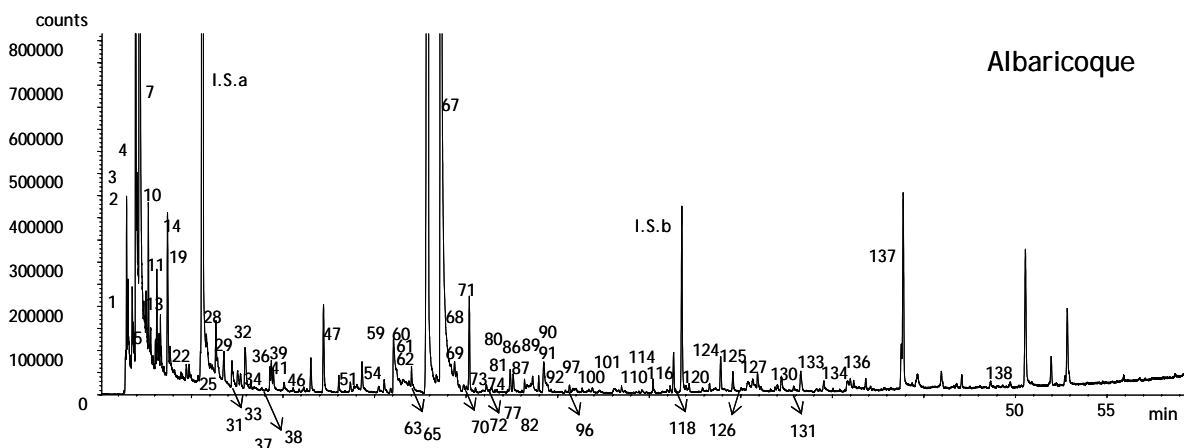


Figura 5.5: Cromatograma de albaricoque obtenido por extracción por SPME (fibra DVB/CAR/PDMS) y determinación GC/MS. (Los números coinciden con la Tabla 2 de la publicación del apartado 4.2.3).

En albaricoque se han identificado numerosas familias químicas destacando los terpenos y norisoprenoides tanto cuali como cuantitativamente (Figura 5.5).

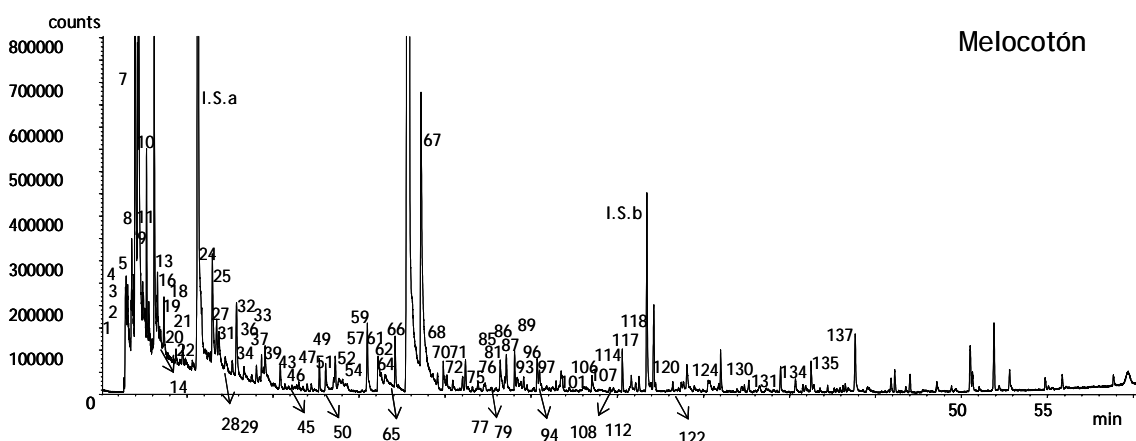


Figura 5.6: Cromatograma de melocotón obtenido por extracción por SPME (fibra DVB/CAR/PDMS) y determinación GC/MS. (Los números coinciden con la Tabla 2 de la publicación del apartado 4.2.3).

En el melocotón se han identificado las lactonas que según la bibliografía son los compuestos impacto del aroma de esta fruta además de terpenos, norisoprenoides, y ésteres, mientras que la pera se caracteriza principalmente por ésteres y alcoholes.

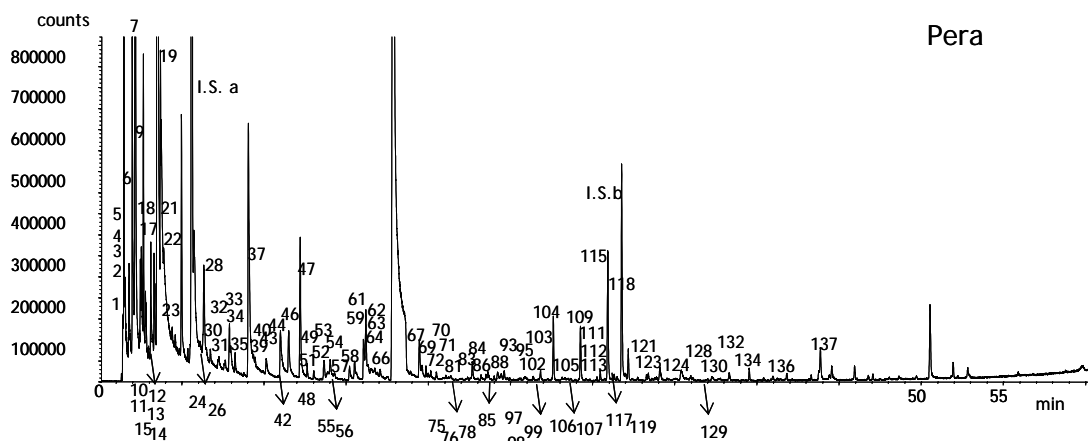


Figura 5.7: Cromatograma de pera obtenido por extracción por SPME (fibra DVB/CAR/PDMS) y determinación GC/MS. (Los números coinciden con la Tabla 2 de la publicación del apartado 4.2.3).

Estos perfiles de las muestras control, se han comparado a los obtenidos al utilizar enzimas pectolíticas para comprobar el efecto de los polisacáridos sobre la composición volátil. La primera conclusión es que los resultados dependen del tipo de fruta pero también de la variedad de ésta. Probablemente esto sea debido a las características propias de la matriz de cada variedad. La fruta en la cual los enzimas utilizados han dado mejores resultados es en el albaricoque. En las muestras control, o sin tratamiento pectolítico, el zumo resultante es pobre en terpenoides y norisoprenoides. Esto coincide con una mayor concentración de polisacáridos en los controles lo que puede afectar al contenido de los compuestos volátiles en el espacio de cabeza. Esta posible retención puede deberse a un efecto de la viscosidad que proporcionan las pectinas, pero también puede estar provocado por la unión entre los volátiles y otros componentes de la matriz. A la vez se observa un efecto sobre los precursores glicosídicos. El tratamiento con enzima de extracción causa un aumento de algunos volátiles, pero también de las fracciones de polisacáridos de menor peso molecular (<1000 Da) que probablemente sean mono o oligosacáridos que se encuentran unidos a algunos compuestos volátiles varietales.

En melocotón, el comportamiento de los compuestos volátiles varía también según el tratamiento enzimático. En este caso el tratamiento con enzima de extracción produce zumos con menor contenido de algunos compuestos tipo lactonas. Esto parece estar relacionado con la retención causada por los polisacáridos ya que su contenido en este grupo de muestras es mayor. En esta fruta no se observa actividad glicosídica ya que no hay aumento de oligosacáridos (<1000 Da).

En referencia a la pera, las muestras que no han sido tratadas enzimáticamente presentan mayores cantidades de E-2,Z-4-decadienoato de metilo y de etilo, volátiles que están ampliamente descritos en la literatura como los compuestos impacto del aroma de la pera.

Así pues, el efecto del tratamiento enzimático sobre los aromas varía en función de la fruta. Aunque el tratamiento enzimático se elige habitualmente por razones económicas y prácticas, por ejemplo para aumentar el rendimiento de extracción o para facilitar la clarificación del mosto, debería también tenerse en cuenta la obtención de zumos aromáticamente óptimos.

## 6 Conclusiones

## 6 Conclusiones

1) Se ha comprobado la validez de la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para identificar y cuantificar compuestos volátiles de bebidas derivadas de fruta alcohólicas y no alcohólicas. Sus principales características son: rapidez, sencillez, bajo coste y, además es respetuoso con el medio ambiente, lo que le convierte en un método apropiado para ser utilizado en la industria como análisis de rutina y control de calidad:

1a) Se ha caracterizado un amplio perfil volátil, constituido por familias químicas diversas en los zumos y néctares de las tres frutas estudiadas, albaricoque, melocotón y pera. Se han identificado por primera vez algunos norisoprenoides, principalmente de tipo naftaleno, que podrían ser característicos del aroma de albaricoque y melocotón.

1b) Aunque los resultados obtenidos mediante análisis discriminante son todavía preliminares, nos indican que el origen biológico o convencional de las frutas podría distinguirse en función de los compuestos volátiles y, en consecuencia, éstos podrían ser potenciales marcadores del origen.

1c) A pesar de que los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el método HS/SPME es discriminante, ésta propiedad depende del tipo de fibra elegido. Ésta condición se deduce de la aplicación del método a dos series de cava durante un largo periodo de rima. Se ha comprobado cómo, a pesar que las dos fibras estudiadas (PDMS y DVB/CAR/PDMS) dan un perfil volátil similar, la de triple recubrimiento permite además diferenciar los cavas en función del tiempo de crianza. Los compuestos volátiles evolucionan a lo largo del envejecimiento: los acetatos (de isoamilo, hexilo y 2-feniletilo) disminuyen su contenido con el tiempo, mientras que los aromas post-fermentativos como succinato de dietilo, vitispirano y 1,2-dimetilo-

1,1,6-trimetilnaftaleno (TDN) aumentan. Estos norisoprenoides (vitispirano y TDN) son probablemente de origen varietal y provienen de un norisoprenoide precursor; están ligados a una molécula de azúcar o bien provienen directamente del metabolismo de los carotenos.

2) El método de cromatografía de gel permeación (GPC), ha demostrado su capacidad discriminante en muestras de zumos y néctares comerciales. A partir de la composición en polisacáridos de distinta masa molecular, se pueden diferenciar las muestras de distinto origen, convencional y biológico.

3) Al aplicarse el método de GPC a mostos de la misma variedad (Parellada), se mantiene su capacidad discriminante, pudiendo diferenciar entre mostos que proceden de distinto rendimiento productivo de uva en la vid (kg/ha) e indicando que los mostos obtenidos de viñas con una menor explotación, inferior a 15000 Kg/ha, son los que presentan mayores cantidades de las fracciones de polisacáridos que favorecen la calidad del vino destinado a la elaboración de cava.

4) En la composición volátil de frutas, albaricoque, melocotón y pera, se identifican numerosas familias químicas (aldehídos, cetonas, alcoholes, terpenoides, norisoprenoides,...). Por primera vez se han detectado 2 norisoprenoides,  $\alpha$ -isoforon y teaspirano B en albaricoque y melocotón.

5) Al aplicar enzimas pectolíticos, el efecto del tratamiento enzimático depende de la variedad de fruta. En el caso del albaricoque, los dos enzimas (extracción y clarificación) incrementan la cantidad de terpenos y norisoprenoides en el zumo. Mientras que en el melocotón y pera estos tratamientos no favorecen el aroma, ya que disminuyen el contenido de los respectivos compuestos impacto,  $\gamma$ -decalactona y E2,Z4-decadienoato de etilo. Este efecto podría ser debido al papel que juegan

algunas fracciones de polisacáridos, afectadas por los enzimas, en la retención de los compuestos volátiles del espacio de cabeza.

## **7 Referencias bibliográficas**



## 7 Referencias bibliográficas

Abbott, J.A. Quality measurement of fruits and vegetables. *Postharvest biol. technol.* 1999, 15, 207-225.

Aleixandre, J.L.; Lizama, V.; Alvarez, I.; García, M.J. Varietal differentiation of red wines in the Valencian region (Spain). *J Agric.Food Chem.* 2002, 50, 751-755.

Alpendurada, M.F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J.Chromatogr. A.* 2000, 889, 3-14.

Aranda, R.; Kruus, P.; Burk, R.C. Assessment of polycrystalline graphites as sorbents for solid-phase microextraction of nonionic surfactants. *J. Chromatogr. A.* 2000, 888, 35-41.

Arthey, D.; Ashurst, P.R. *Procesado de frutas*. Ed. Acribia, S.A. (Zaragoza, España, 1997).

Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 1990, 62, 2145-2148.

Aubert, C.; Günata, Z.; Ambid, C.; Baumes, R. Changes in physicochemical characteristics and volatile constituents of yellow- and white-fleshed nectarines during maturation and artificial ripening. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 3083-3091.

Augusto, F.; Pires Valente, A.L.; dos Santos Tada, E.; Rivellino, S.R. Screening of brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2000, 873, 117-127.

Ayala-Zavala, J.F.; Wang, S.Y.; Wang, C.Y.; González-Aguilar, G.A. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit. *Lebens.-Wiss. U.-Technol.* 2004, 37, 687-695.

Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Janssen, H.-G.; Cramers, C. Study into the Equilibrium Mechanism between Water and Poly(dimethylsiloxane) for Very Apolar Solutes: Adsorption or Sorption? *Anal. Chem.* 1999, 71, 5213 - 5216.

Baptista, J.A.B.; Tavares, J. F. da P.; Carvalho, R.C.B. Comparison of polyphenols and aroma in red wines from Portuguese mainland versus Azores Islands. *Food Res. Int.* 2001, 34, 345-355.

Bartak, P.; Cap, L. Determination of phenols by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A.* 1997, 767, 171-175.

Belitz, H.D.; Grosch, W. *Química de los alimentos*. 1a Edición. Ed. Acribia, S.A. 1988, pp. 629-677, Zaragoza, España.

Bellavia, V.; Natangelo, M.; Fanelli, R.; Rotilio, D. Analysis of Benzothiazole in Italian wines using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 1239-1242.

Bentivenga, G.; D'Auria, M.; Fedeli, P. SPME-GC-MS analysis of volatile organic compounds in honey from Basilicata. Evidence for the presence of pollutants from anthropogenic activities. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2004, 39, 1079-1086.

Berrada, H.; Font, G.; Molto, J.C. Application of solid-phase microextraction for determining phenylurea herbicides and their homologous anilines from vegetables. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1042, 9-14.

Blasco, C.; Font, G.; Manes, J.; Pico, Y. Solid-phase microextraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry to determine postharvest fungicides in fruits. *Anal. Chem.* 2003, 75, 3606-3615.

Boletín Oficial del Estado 2 de Agosto de 2003 por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana. 15479 Real Decreto 1050/2003 de 1 de Agosto 2003 BOE nº 184: 29970-74.

Boletín Oficial del Estado 20 de Noviembre de 1991. Reglamento de la Denominación "Cava" y de su Consejo Regulador. Orden 14 de Noviembre 1991 BOE nº 189278: 37587-93.

Bonino, M.; Schellino, R.; Rizzi, C.; Aigotti, R.; Delfini, C.; Baiocchi, C. Aroma compounds of an Italian wine (Ruché) by HS/SPME analysis coupled with GC-ITMS. *Food Chem.* 2003, 80, 125-133.

Botondi, R.; DeSantis, D.; Bellicontro, A.; Vizovitis, K.; Mencarelli, F. Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1189-1200.

Boyd-Boland, A.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction of Nitrogen Containing Herbicides, *J. Chromatogr. A.* 1995, 704, 163-172.

Buxaderas, S.; López-Tamames, E. Production of sparkling wines, in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Vol. 10, 2nd Edn. Elsevier Science Ltd, St Louis, MO, 2003, pp 6203-6210.

Cacho Palomar, J. F. El vino, su composición y nuestros sentidos. Discurso de Ingreso en la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza, 2003.

Capelli, P.; Vannucchi, V. *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione.* Zanichelli, Bologna. 1998, 67-90.

Carbonell, E.; Costell, E.; Duran, L. Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.* 1990, 30, 1-9.

Carrión, M.N.; Santos, F.J.; Galcerán, M.T. Determination of chlorophenols by solid-phase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 2002, 947, 155-165.

Chapman, G.W.; Horvat, R. J.; Forbus, W.R. Jr. Physical and chemical changes during the maturation of peaches (Cv. Majestic). *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 867-870.

Chariote, G.; Rodriguez, F.; Crouzet, J. Characterization of additional volatile flavor components of apricot. *J. Food Sci.* 1981, 46, 1898-1901.

Charles-Bernard, M.; Kraehenbuehl, K.; Rytz, A.; Roberts, D.D. Interactions between volatile and nonvolatile coffee components.1. Screening of nonvolatile components. *J. Agric. Food Chem.* 2005a, 53, 4417-4425.

Charles-Bernard, M.; Roberts, D.D.; Kraehenbuehl, K. Interactions between volatile and nonvolatile coffee components.2. Mechanistic study focused on volatile thiols. *J. Agric. Food Chem.* 2005b, 53, 4426-4433.

Chen, J.; Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2530-2533.

Clark, T.J.; Bunch, J.E. Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 844-849.

Comuzzo, P.; Tat, L.; Tonizzo, A.; Battistutta, F. Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chem.* 2006, In press.

Consejo Regulador del Cava. [Disponible en: [www.crcava.es](http://www.crcava.es)]

Constant, M. Headspace gas chromatography profiles of fruit flavored malt beverages using solid-phase microextraction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1997, 55, 112-118.

de la Calle-García, D.; Magnaghi, S.; Reichenbacher, M.; Danzer, K. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *J. High Resol. Chromatogr.* 1996, 19, 257-262.

de la Calle-García, D.; Reichenbacher, M.; Danzer, K. Analysis of wine bouquet components using solid-phase microextraction capillary gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.* 1998, 21, 373-377.

de la Calle-García, D.; Reichenbacher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Bartzsch, C.; Feller, K.H. Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers. *J. High Resol. Chromatogr.* 1997, 20, 665-668.

de la Calle-García, D.; Reichenbacher, M.; Danzer, K.; Hurlbeck, C.; Bartzsch, C.; Feller, K.H. Use of solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 360, 784-787.

Derail, C.; Hofmann, T.; Schieberle, P. Differences in key odorants of handmade juice of yellow-flesh peaches (*Prunus persica* L.) induced by the workup procedure. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 4742-4745.

Directiva 2001/112CE del Consejo de 20 de diciembre de 2001 relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana L10/58-66.

Di Cesare, L.F.; Nani, R.; Mariani, N.; D'Angelo V. Influenza delle maltodestrine, ciclodestrine e dell'olio di palma sulla ritenzione degli aromi nei disidratati di albicocca. *Industrie delle Bevande*. 1996, XXV, 101-107.

Doco, T.; Lecas, M.; Pellerin, P.; Brillouet, J.M. et Moutounet, M. Les polysaccharides pectiques de la pulpe et de la pellicule de raisin. *Rev. Fr. Oenol.* 1995, 153, 16-23.

Doco, T.; Williams, P.; Vidal, S.; Pellerin, P. Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydr. Res.* 1997, 297, 181-186.

Doong, R.A.; Liao, P.L. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A.* 2001, 918, 177-188.

Edwards, G.; Beelman, R.B. Extraction and analysis of volatile compounds in white wines using Amberlite XAD-2 resin and capillary GC. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 216-220.

Escalona, H.; Birkmyre, L.; Piggott, J.R.; Paterson, A. Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 458, 45-54.

Femenia, A.; Sánchez, E.S.; Simal, S.; Roselló, C. Developmental and ripening-related effects on the cell wall of apricots (*Prunus armeniaca*) fruit. *J. Sci. Food. Agric.* 1998, 77, 487-493.

Feria Mundial de la Técnica para las Bebidas. Drinktec-Interbrau celebrada en Munich 2001 [Disponible en <http://www.drinktec-interbrau.de>]

Ferrari, R.; Nilsson, T.; Arena, R.; Arlati, P.; Bartolucci, G.; Basla, R.; Cioni, F.; Del Carlo, G.; Dellavedova, P.; Fattore, E.; Fungi, M.; Grote, C.; Guidotti, M.; Morgillo, S.; Müller, L.; Volante, M. Interlaboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/L level in water samples. *J. Chromatogr. A.* 1998, 795, 371-376.

Ferreira, A.; Rapp, A.; Cacho, J.F.; Hastrich, H.; Yavas, I. Fast and quantitative determination of wine flavor compounds using microextraction with Freon 113. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 1413-1420.

Ferreira, V. Uva, levadura, y aditivos de fermentación. ¿Quién es quién en la formación de los aromas del vino blanco? Perspectivas de control y mejora. XX Congreso Internacional del Cava, 2002, 21 Semana del Cava, Sant Sadurní d'Anoia, España.

Ferreira, V.; Ortín, N.; Escudero, A.; López, R.; Cacho, J. Chemical characterization of the aroma of Grenache rosé wines. Aroma Extract Dilution Analysis, quantitative determination and sensory reconstitution studies. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4048-4054.

Feuillat, M.; Charpentier, C. Autolysis of yeasts in Champagne. *Am. J. Enol. Vitic.* 1982, 33, 6-13.

Finzi, F. L'impiego della pectina nella produzione industriale di confettura, *Tecnologie alimentari.* 1999, 4, 76-86.

Fischer, C.; Fischer, U. Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1995-1997.

Flavours their encapsulation and release. [Disponible a: <http://alfa.ist.utl.pt/~fidel/fidel3topics.html>]

Flores, G.; Ruiz del Castillo, M.L.; Blanch, G.P.; Herraiz, M. Effect of sample freezing on the SPME performance in the analysis of chiral volatile compounds in foods. *Food Chem.* 2005, In Press.

Francioli, S.; Guerra M.; López-Tamames, E.; Guadayol, J.M.; Caixach, J. Aroma of sparkling wines by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Am. J. Enol. Vitic.* 1999, 50, 404-408.

Francioli, S.; Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Aroma compounds by SPME/GC as age markers of sparkling wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 2003, 54, 158-162.

Fügel, R.; Carle, R.; Schieber, A. A novel approach to quality and authenticity control of fruit products using fractionation and characterisation of cell wall polysaccharides. *Food Chem.* 2004, 87, 141-150.

Galindo, P. Aguas, Zumos, Cervezas y Refrescos. Innovación y Crecimiento en un mercado maduro. Distribución y consumo. 2004, pp. 37-43.

Gallart, M.; Francioli, S.; Viu-Marco, A.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Determination of free fatty acids and their ethyl esters in musts and wines. *J. Chromatogr. A*. 1997, 776, 283-291.

Gandini, N.; Riguzzi, R. Headspace Solid-Phase Microextraction Analysis of Methyl Isothiocyanate in Wine. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3092-3094.

García-Jares, C.; García-Martín, R.; Cela-Torrijo, R. Analysis of some volatile highly volatile compounds of wine by means of purge and cold trapping injector capillary gas chromatography. Application to the differentiation of Rias Baixas spanish white wines. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 764-768.

Gbatu, T.P.; Sutton, K.L.; Caruso, J.A. Development of new SPME fibers by sol-gel technology for SPME-HPLC determination of organometals. *Anal. Chim. Acta.* 1999, 402, 67-79.

Godshall, M.A. How carbohydrates influence food flavor. *Food Technol.* 1997, 51, 63-66.

Gómez, E.; Ledbetter, C.A. Development of volatile compounds during fruit maturation: characterization of apricot and plum × apricot hybrids. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 74, 541-546.

Gorecki, T.; Pawliszyn, J. Determination of tetraethyllead and inorganic lead in water by solid phase microextraction/Gas chromatography. *Anal. Chem.* 1996, 68, 3008-3014.

Gorecki, T.; Yu, X.M.; Pawliszyn, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst.* 1999, 124, 643-649.

Guadarrama, A.; Fernández, J.A.; Íñiguez, M.; Souto, J.; de Saja, J.A. Discrimination of wine aroma using an array of conducting polymer sensors in conjunction with solid-phase microextraction (SPME) technique. *Sensors and Actuators B.* 2001, 77, 401-408.

Guichard, E.; Etiévant, P. Measurement of interactions between polysaccharides and flavour compounds by exclusion size chromatography: Advantages and limits. *Nahrung*. 1998, 42, 376-379.

Guichard, E.; Schlick, P.; Issanchou, S. Composition of apricot aroma: correlations between sensory and instrumental data. *J. Food Sci.* 1990, 55, 735-738.

Guichard, E.; Souty, M. Comparison of the relative quantities of aroma compounds found in fresh apricot (*Prunus armeniaca*) from six different varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1988, 186, 301-307.

Guillot, S.; Peytavi, L.; Bureau, S.; Boulanger, R.; Lepoutre, J.-P.; Crouzet, J.; Schorr-Galindo, S. Aroma characterization of various apricot varieties using headspace-solid phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *Food Chem.* 2005, In Press.

Hall, B.; Brodbelt, J. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1997, 777, 275-282.

Hansson, A.; Andersson, J.; Leufvén, A. The effect of sugars and pectin on flavour release from a soft drink-related model system. *Food Chem.* 2001, 72, 363-368.

Hansson, A.; Leufvén, A.; van Ruth, S. Partition and release of 21 aroma compounds during storage of a pectin gel system. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2000-2005.

Harrison, M.; Hills, B.P. Mathematical model of flavor release from liquids containing aroma-binding macromolecules. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1883-1890.

Hayasaka, Y.; Bartowsky, E.J. Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 612-617.

Hedge, S.; Maness, N.O. Sugar composition of pectin and hemicellulose extracts of peach fruit during softening over two harvest seasons. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 1996, 121, 1162-1167.

Hernandez-Borges, J.; Cifuentes, A.; Garcia-Montelongo, F.J. Combining solid-phase microextraction and on-line preconcentration-capillary electrophoresis sensitive analysis of pesticides in foods. *Electrophoresis.* 2005, 26, 980-989.



Hernandez-Borges, J.; Rodriguez-Delgado, M.A.; Garcia-Montelongo, F.J. Highly sensitive analysis of multiple pesticides in foods combining solid-phase microextraction, capillary electrophoresis-mass spectrometry and chemometrics. *Electrophoresis*. 2004, 25, 2065-2076.

Horvat, R.J.; Chapman, G.W. Comparison of volatile compounds from peach fruit and leaves (Cv. Monroe) during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 1442-1444.

Horvat, R.J.; Chapman, G.W.; Robertson, J.A.; Meredith, F.I.; Scorza, R.; Callahan, A.M.; Morgens, P. Comparison of the volatile compounds from several commercial peach cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 234-237.

Hu, R.W.; Hennion, B.; Urruty, L.; Montury, M. Solid phase microextraction of pesticide residues from strawberries. *Food Additives and Contaminants*. 1999, 16, 111-117.

Ibañez, E.; López-Sebastián, S.; Ramos, E.; Tabera, J.; Reglero, G. Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chem.* 1998, 63, 281-286.

Insa, S.; Salvado, V.; Antico, E. Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples. *J. Chromatogr. A*. 2004, 1047, 15-20.

Ishii, S. Enzymatic extraction and linkage analysis of pectic polysaccharides from onion. *Phytochem.* 1982, 21, 778-780.

Jia, M.; Zhang, H.; Min, D.B. Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chem.* 1999, 65, 445-451.

Jia, M.; Zhang, Q.H.; Min, D.B. Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 2744-2747.

Jimenez, A.; Rodriguez, R.; Fernandez-Caro, I.; Guillén, R.; Fernandez-Bolanos, J.; Heredia, A. Olive fruit cell wall: degradation of pectic polysaccharides during ripening. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 409-415.

Jouquand, C.; Ducruet, V.; Giampaoli, P. Partition coefficients of aroma compounds in polysaccharide solutions by the phase ratio variation method. *Food Chem.* 2004, 85, 467-474.

Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology.* 2001, 77, 215-227.

Kataoka, H.; Lord, H.L.; Pawliszyn, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. Review. *J. Chromatogr. A.* 2000, 880, 35-62.

Kenneth A.; Rubinson, J.; Rubinson, F. *Análisis Instrumental.* Prentice Hall, Pearson Educación S.A. Madrid, 2001.

Kobayashi, M.; Match, T.; Azuma, J.-L. Two Chains of Rhamnogalacturonan II Are Cross-Linked by Borate-Diol Ester Bonds in Higher Plant Cell Walls. *Plant Physiol.* 1996, 110, 1017-1020.

Koster, E.H.M.; Crescenzi, C.; den Hoedt, W.; Ensing, K.; de Jong, G.J. Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3140-3145.

Krogh, M.; Grefslie, K.E.; Rasmussen, K.E. Solvent-modified solid-phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1997, 689, 357-364.

Lamikanra, O.; Richard, O.A. Effect of storage on some volatile compounds in fresh-cut cantaloupe melon. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 4043-4047.

Legislación europea. [ Disponible a: <http://europa.eu.int/comm/agriculture/>]

Leoni, C.; Fortini, G. Presenza e comportamento delle sostanze pectiche nel pomodoro e nei suoi derivati. *Industrie delle conserve.* 1985, 60, 9-17.

Llompert, M.; Li, K.; Fingas, M. Headspace solid phase microextraction (HS/SPME) for the determination of volatile and semivolatile pollutants in soils. *Talanta.* 1999, 48, 451-459.

Lord, H.; Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A.* 2000, 885, 153-193.

Louch, D.; Motlagh, S.; Pawliszyn, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. *Anal. Chem.* 1992, 64, 1187-1189.

Malkki, Y.; Heinio, R.L.; Autio, K. Influence of oat gum, guar gum and carboxymethyl cellulose on the perception of sweetness and flavour. *Food Hydrocolloids.* 1993, 6, 525-532.

Mallouchos, A.; Komaitis, M.; Koutinas, A.; Kanellaki, M. Investigation of volatiles evolution during the alcoholic fermentation of grape must using free and immobilized cells with the help of solid phase microextraction (SPME) headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3840-3848.

Mangani, F.; Cenciarini, R. Solid phase microextraction using fused silica fibers coated with graphitized carbon black. *Chromatographia.* 1995, 41, 678-684.

Marengo, E.; Aceto, M.; Maurino, V. Classification of Nebbiolo-based wines from Piedmont (Italy) by means of solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry of volatile compounds. *J. Chromatogr. A.* 2001, 943, 123-137.

Margheri, G.; Gianotti, L.; Pellegrini, R.; Mattarei, C. Vini spumanti di qualità. Metodo champenoise. *Vini d'Italia.* 1984, 26, 57-63.

Martí, M.P.; Mestres, M.; Sala, C.; Bustos, O.; Guasch, J. Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7861-7865.

Martinez-Urunuela, A.; Gonzalez-Saiz, J.M.; Pizarro, C. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine, *J Chromatogr. A.* 2004, 1056, 49-56.

Matich, A.J.; Rowan, D.D.; Banks, N.H. Solid phase microextraction for quantitative headspace sampling of apple volatiles. *Anal. Chem.* 1996, 68, 4114-4118.

Memoria 2004. Federación Española del Vino. Asamblea General, 30 de marzo de 2005. [ Disponible a: [www.fev.es](http://www.fev.es)]

Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace SPME analysis of volatile sulphides and disulphides in wine aroma. *J. Chromatogr. A.* 1998, 808, 211-218.

Mestres, M.; Sala, C.; Marit, M.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace SPME of sulphides and disulphides using carboxen/PDMS fibers in the analysis of wine aroma. *J. Chromatogr. A.* 1999a, 835, 137-144.

Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Simultaneous analysis of thiols, sulphides and disulphides in wine aroma by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999b, 849, 293-297.

Mestres, M.; Martí, M.P.; Miracle, M.; Sala, C.; Busto, O.; Guasch, J. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis de aroma en vinos. *Técnicas de laboratorio.* 2000, 251, 289-295.

Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Application of headspace solid-phase microextraction to the determination of sulphur compounds with low volatility in wines. *J. Chromatogr. A.* 2002, 945, 211-219.

Miller, M.E.; Stuart, J.D. Comparison of gas-sampled and SPME-sampled static headspace for the determination of volatile flavor components. *Anal. Chem.* 1999, 71, 23-27.

Monje, M.C.; Privat, C.; Gastine, V.; Nepveu, F. Determination of ethyl phenol compounds in wine by headspace solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography and flame ionization detection. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 458, 111-117.

Morris, E.R. Organoleptic properties of food polysaccharides in thickened systems. In *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*. M. Yalpani, Ed. Elsevier Science: Amsterdam, 1987, pp. 225-238.

Motlagh, S.; Pawliszyn, J. On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography. *Anal. Chim. Acta.* 1993, 284, 265-273.

Muda, P.; Seymour, G.B.; Errington, N.; Tucker, G.A. Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. *Carbohydr. Polymers.* 1995, 26, 255-260.

Murányi, Z.; Kovács, Z. Statistical evaluation of aroma and metal content in Tokay wines. *Microchemical J.* 2000, 67, 91-96.

Narain, N.; Hsieh, T.C.-Y.; Johnson, C.E. Dynamic headspace concentration and gas chromatography of volatile flavor components in peach. *J. Food Sci.* 1990, 55, 1303-1307.

Negrao, R.; Alpendurada, M.F. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction - high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A.* 1998, 823, 211-218.

Nehring, P.; Prehn, H.J.; Skott, W.P. Fruchtgehaltsbestimmung in Konfitüren. *Industrielle Obst-und Gemüseverwertung.* 1978, 63, 559-566.

Nelly, M.T.; Larroque, M. Trace determination of diethylphthalate in aqueous media by solid-phase microextraction-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1999, 841, 177-185.

Nicolosi Asmundo, C.; Cataldi Lupo, M.C.; Campisi, S. La componente aromatica di uno spumante champenois (prodotto da uve Nerello mascalese). *Industrie delle bevande.* 1995, XXIV, 247-250.

Ortega-Heras, M.; González-SanJosé, M.L.; Beltrán, S. Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Anal. Chim. Acta.* 2002, 458, 85-93.

Paliyath, G.; Whiting, M.D.; Stasiak, M.A.; Murr, D.P.; Clegg, B.S. Volatile production and fruit quality during development of superficial scald in Red Delicious apples. *Food Res. Int.* 1997, 30, 95-103.

Panel de Consumo Alimentario. Estudios sobre la comercialización Agroalimentaria en España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaria General de Agricultura y Alimentación, D.G. de Industria Agroalimentaria y Alimentación, 2004 [Disponible a : <http://www.mapya.es/>].

Pawliszyn, J. Applications of solid phase microextraction. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

Pawliszyn, J. Solid Phase Microextraction, theory and practice. Wiley-VCH, New York, 1997.

Pellerin, P.; Doco, T.; Vidal, S.; Williams, P.; Brillouet, J.M.; O'Neill, M.A. Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydr. Res.* 1996, 290, 193-197.

Pelusio, F.; Nilsson, T.; Montanarella, T.; Tilio, R.; Larsen, B.; Facchetti, S.; Madsen, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile organic sulphur compounds in black and white truffle. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2138-2143.

Peñalver Herrando, A. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. Tesis Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2002.

Peñalver, A.M.; Pocurull, E.; Borrull, F.; Marcé, R.M. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *J. Chromatogr. A.* 2002, 953, 79-87.

Pérez, A.G.; Luaces, P.; Oliva, J.; Ríos, J.J.; Sanz, C. Changes in vitamin C and flavour components of mandarin juice due to curing of fruits. *Food Chem.* 2005, 91, 19-24.

Phillips, G.O.; Williams, P.A. Handbook of hydrocolloids. Capítulo 10: Pectins. CRC Press (Boca Raton, Boston, New York, Washington DC). Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington, Cambridge, England, 2000.

Pillonel, L.; Bosset, J.O.; Tabacchi, R. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2002, 35, 1-14.

Poerschmann, J.; Gorecki, T.; Kopinke, F.D. Sorption of very hydrophobic organic compounds onto poly(dimethylsiloxane) and dissolved humic organic matter. 1. Adsorption or partitioning of VHOC on PDMS-coated solid-phase microextraction fibers - A never-ending story? *Environmental Sci. Tech.* 2000, 34, 3824-3830.

Polesello, A.; Di Cesare, L.F.; Nani R. Recupero degli aromi dagli ortofruitticoli mediante estrazione in fase solida. *Industrie delle Bevande.* 1989, 18, 93-101.

Popp, P.; Paschke, A. Efficiency of direct solid phase microextraction from water - a comparison of different fibre types including a new C8-coating. *Chromatographia.* 1999, 49, 686-690.

Pozo-Bayón, M.A.; Polo, M.C.; Martín- Alvarez, P.J.; Pueyo, E. Effect of vineyard yield on the composition of sparkling wines produced from the grape cultivar Parellada. *Food Chem.* 2004, 86, 413-419.

Pozo-Bayón, M.A.; Pueyo, E.; Martín-Alvarez, P.J.; Polo, M.C. Polydimethylsiloxane solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. Its application to the characterization of varietal wines. *J. Chromatogr. A.* 2001, 922, 267-275.

Primo Yúfera, E. *Química de los alimentos.* 1998, Ed. Síntesis S.A, Madrid, España.

Rabe, S.; Krings, U.; Berger, R.G. Influence of oil-in-water emulsion characteristics on initial dynamic flavour release. *J. Food Sci. Agric.* 2003, 83, 1124-1133.

Redgwell, R.J.; Melton, L.D.; Brasch, D.J. Cell wall dissolution in kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). Solubilization of pectic polymers. *Physiol. Plant.* 1992, 98, 71-81.

Redgwell, R.J.; Melton, L.D.; Brasch, D.J.; Coddington, J.M. Structures of the pectic polysaccharides from the cell walls of kiwifruit. *Carbohydr. Res.* 1992, 226, 287-302.

Rega, B.; Fournier, N.; Nicklaus, S.; Guichard, E. Role of pulp in flavor release and sensory perception in orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 4204-4212.

Reglamento (CE) N° 1493/1999 de 17 de mayo de 1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola L179/1-84.

Reid, L. M.; O'Donnell, C.P.; Downey, G. Potential of SPME-GC and chemometrics to detect adulteration of soft fruit purées. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 421-427.

Rizzolo, A.; Lombardi, P.; Vanoli, M.; Polesello, S. Use of capillary gas chromatography/sensory analysis as an additional tool for sampling technique comparison in peach aroma analysis. *J. High Resol. Chromatogr.* 1995, 18, 309-314.

Rizzolo, A.; Polesello, A.; Polesello, S. Use of headspace capillary GC to study the development of volatile compounds in fresh fruit. *J. High Resol. Chromatogr.* 1992, 15, 472-477.

Roberts, D.D.; Elmore, S.; Langely, K.R.; Bakker, J. Effect of sucrose, guar gum and carboxymethylcellulose on the release of volatile flavor compounds under dynamic conditions. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 1321-1326.

Robertson, J.A.; Meredith, F.I.; Horvat, R.J.; Senter, S.D. Effect of cold storage and maturity on the physical and chemical characteristics and volatile constituents of peaches (Cv. Cresthaven). *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 620-624.

Rocha, S.; Ramalheira, V.; Barros, A.; Delgadillo, I.; Coimbra, M.A. Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in a wine model. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 5142-5151.

Rodríguez-Bencomo, J.J.; Conde, J.E.; Rodríguez-Delgado, M.A.; García-Montelongo, F.; Pérez-Trujillo, J.P. Determination of esters in dry and sweet white wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2002, 963, 213-223.

Rolin, C.; Nielsen, B.U.; Glahn Poul, E. *Pectin*. 1998, pp. 377-432. Polysaccharides, Dumitriu S., Marcel Dekker Inc., New York.

Rose, J.K.C.; Hadfield, K.A.; Labavitch, J.M.; Benette, A.B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol.* 1998, 117, 345-361.

Rudell, D.R.; Mattison, D.S.; Mattheis, J.P.; Wyllie, S.G.; Fellman, J.K. Investigations of aroma volatile biosynthesis under anoxic conditions and in different tissues of "Redchief Delicious" apple fruit (*Malus domestica* Borkh.). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2627-2632.

Ruiz del Castillo, M.L.; Caja, M.M.; Herraiz, M. Use of enantiomeric composition for the assessment of fruit beverages. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1284-1288.

Ruiz del Castillo, M.L.; Dobson, G. Varietal differences in terpene coomposition of blackcurrant (*Ribes nigrum* L) berries by solid phase microextraction/gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 2002, 82, 1510-1515.

Ruiz Hernández, M.; Martínez Garoña, M. *Curso popular de cata de vinos*. Edita: Gobierno de la Rioja, Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, 1997.

Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A.* 2000, 880, 93-99.



Sala, C.; Mestres, M.; Martí, M.P.; Busto, O.; Guasch, J. Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J. Chromatogr. A.* 2002, 953, 1-6.

Salinas, M.R.; Alonso, G.L.; Esteban-Infantes, F.J. Adsorption-Thermal desorption gas chromatography applied to the determination of wine aromas. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1328-1331.

Sandra, P.; Haghebaert, K.; David, F. Analysis of pesticides in environmental water samples by solid phase microextraction (SPME)-CGC-MS. *International Environmental Technology.* 1996, pp: 6-7.

Savary, B.J.; Nuñez, A. Gas Chromatography-Mass Spectrometry method for the determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope solution. *J. Chromatogr. A.* 2003, 1017, 151-159.

Schneider, R.; Baumes, R.; Bayonove, C.; Razungles, A. Volatile compounds involved in the aroma of sweet fortified wines (Vins Doux Naturels) from Grenache Noir. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3230-3237.

Schols, H.A.; Posthumus, M.A.; Voragen, A.G.J. Structural features of hairy regions of pectins isolated from apple juice produced by the liquefaction process. *Carbohydr. Res.* 1990, 206, 117-129.

Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. Occurrence of pectic hairy regions in various plant cell wall materials and their degradability by rhamnogalacturonase. *Carbohydr. Res.* 1994, 256, 83-95.

Schulbach, K.F.; Rouseff, R.L.; Sims, C.A. Changes in volatile sulfur compounds in strawberry puree during heating. *J. Food Sci.* 2004, 69, 268-272.

Schumacher. Fast screening method of water and soil samples, using solid phase microextraction (SPME). *Supelco*, 1997, 16.

Secouard, S.; Malhiac, C.; Grisel, M.; Decroix, B. Release of limonene from polysaccharide matrices: viscosity and synergy effect. *Food Chem.* 2003, 82, 227-234.

Segarra, I.; Lao, C.; López-Tamames, E.; Torre-Boronat, de la M.C. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.* 1995, 46, 564-570.

Servili, M.; Selvaggini, R.; Taticchi, A.; Begliomini, A.L.; Montedoro, G. Relationships between the volatile compounds evaluated by solid phase microextraction and the thermal treatment of tomato juice: optimization of the blanching parameters. *Food Chem.* 2000, 71, 407-415.

Seuvre, A.M.; Philippe, E.; Rochard, S.; Voilley, A. Retention of aroma compounds in food matrices of similar rheological behaviour and different compositions. *Food Chem.* 2005, In Press.

Sharma, S.K.; Liptay, A.; Le Maguer, M. Molecular characterization, physico-chemical and functional properties of tomato fruit pectin. *Food Res. Int.* 1998, 30, 543-547.

Shirey, R.E. Optimization of extraction conditions for low-molecular-weight analytes using solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* 2000, 38, 109-116.

Siegmund, B.; Derler, K.; Pfannhauser, W. Changes in the aroma of a strawberry drink during storage. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3244-3252.

Silva, A.; Fumi, M.D.; Montesissa, G.; Colombi, M.G.; Colagrande, M.G. Osservazioni sperimentali sulla conservazione dello spumante in presenza di lieviti. *Industrie delle bevande.* 1988, XVII, 312-327.

Simplicio, A.L.; Boas L.V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *J. Chromatogr. A.* 1999, 833, 35-42.

Song, J.; Fan, L.; Beaudry, R.M. Application of solid-phase microextraction and gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavor volatiles in tomato and strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3721-3726.

Song, J.; Gardner, B.D.; Holland, J.F.; Beaudry, R.M. Rapid analysis of volatile flavor compounds in apple fruit using SPME and GC/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1801-1807.

Steffen, A.; Pawliszyn, J. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2187-2193.

Suwanagul, A.; Richardson, D.G. Identification of headspace volatile compounds from different pear (*Pyrus communis* L.) varieties. *Acta Horticulturae*, 475, VIIIth International Symposium on Pear Growing, 1997. 1998a, pp. 605-623. International Society for Horticultural Science.

Suwanagul, A.; Richardson, D.G. Pear fruit volatiles characterized by SPME and capillary GLC/MASS Spectroscopy. *Acta Horticulturae*, 475, VIIIth International Symposium on Pear Growing, 1997. 1998b, pp. 599-603. International Society for Horticultural Science.

Takeoka, G.; Flath, R.; Mon, T.; Teranishi, R.; Guentert, M. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *J. Agric. Food Chem.* 1900, 38, 471-477.

Thibault, J.F. Automatisation du dosage de substances pectiques par la méthode au méthahydroxydiphenyl. *Lebensm. Wiss. Technol.* 1979, 12, 247-251.

Thomas, J.R.; Darvill, A.G.; Albersheim, P. Isolation and structural characterization of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II from walls of suspension-cultured rice cells. *Carbohydr. Res.* 1989, 185, 261-277.

Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. Comparison of Headspace-Solid Phase Microextraction Fibers for the Volatile Compounds of Red and White Wines. *J. Chromatogr. Sci.* 2004, 42, 310-316.

Ulrich, S.; Martens, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective method for the assay of antidepressant drug in human plasma. *J. Chromatogr. B.* 1997, 696, 217-234.

Una aproximación a la Industria Española de la Alimentación y Bebidas. FIAB, Madrid, Octubre, 2001.

Urruty, L.; Montury, M. Influence of ethanol on pesticide extraction in aqueous solutions by solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 3871-3877.

Usseglio-Tomasset, L.; Bosia, P.D.; di Stefano, R.; Castino, M. Oggettiva influenza del contatto con i lieviti sulle caratteristiche degli spumanti preparati con il metodo classico. *Vini d'Italia.* 1983, 142, 3-9.

Vaes, W. H. J.; Mayer, P.; Oomen, A. G.; Hermens, J. L. M.; Tolls, J. Comments on "Adsorption versus Absorption of Polychlorinated Biphenyls onto Solid-Phase Microextraction Coatings". *Anal. Chem.* 2000, 72, 639 - 641.

Van Buren, J.P. Function of pectin in plant tissue structure and firmness, 1-5. *The chemistry and technology of pectin.* 1991, Reginald H. Walter, Academic Press Inc., New York.

Van Ruth, S.; King, C. Effect of starch and amylopectin concentrations on volatile flavour release from aqueous model food systems. *Flavour Fragr. J.* 2003, 18, 407-416.

Vas, G.Y.; Gál, J.; Harangi, J.; Dobó, A.; Vékey, K. Determination of volatile aroma compounds of Bläufrankisch wines extracted by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* 1998, 36, 505-510.

Vas, G.Y.; Harangi, J.; Dobo, A.; Vekey, K. Determination of volatile aroma compounds of bläufrankisch wines extracted by solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.* 1998, 36, 505-510.

Vas, G.Y.; Kotelesy, K.; Farkas, M.; Dobo, A.; Vekey, K. Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.* 1998, 49, 100-104.

Vaz Freire, L.M.T.; Costa Freitas, A.M.; Relva, A.M. Optimization of solid phase microextraction analysis of aroma compounds in a Portuguese muscatel wine must. *J. Microcolumn Separations.* 2001, 16, 236-242.

Verhoeven, H.; Beuerle, T.; Schwab, W. Solid-phase microextraction: artefact formation and its avoidance. *Chromatographia.* 1997, 46, 63-66.

Vianna, E.; Ebeler, S.E. Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 589-595.

Villén, J.; Señoráns, F.J.; Reglero, G.; Herraiz, M. Analysis of wine aroma by direct injection in gas chromatography without previous extraction. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 717-722.

Visai, C.; Vanoli, M. Volatile compound production during growth and ripening of peaches and nectarines. *Scientia Horticulturae*. 1997, 70, 15-24.

Vitali, M.; Guidotti, M.; Giovinazao, R.; Cedrone, O. Determination of pesticide residues in wine by SPME and GC/MS for consumer risk assessment. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 280-287.

Voilley, A.; Beghin, V.; Charpentier, C.; Peyron, P. Interactions between aroma substances and macromolecules in a model wine. *Lebesm. -Wiss. u. -Technol.* 1991, 24, 469-472.

Voilley, A.; Lamer, C.; Dubois, P.; Feuillat, M. Influence of macromolecules and treatments on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 248-251.

Wade, N.L.; Kavanagh, E.E.; Hokley, D.G.; Brady, C.J. Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. *J. Sci. Food. Agric.* 1992, 60, 61-68.

Wallrauch, S. Berechnungsformel zur Abschätzung des Fruchtgehaltes in Erdbeerfruchtzubereitungen. *Lebensmittelchemie*. 1995, 49, 40-45.

Wan, X.M.; Stevenson, R.J.; Chen, X.D.; Melton, L.D. Application of headspace solid-phase microextraction to volatile flavour profile development during storage and ripening of kiwifruit. *Food Res. Int.* 1999, 32, 175-183.

Wang, Z; Hennion, B; Urruty, L; Montury, M. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography: a complementary technique to solid-phase microextraction-gas chromatography for the analysis of pesticide residues in strawberries. *Food Additives and Contaminants*. 2000, 17, 915-923.

Weber, J.; Beeg, M.; Bartsch, C.; Feller, K.H.; de la Calle Garcia, D.; Reichenbacher, M.; Danzer, K. Improvement of the chemometric variety characterization of wines by improving the detection limit for aroma compounds. *J. High Resol. Chromatogr.* 1999, 22, 322-326.

Whiton, R.S.; Zoecklein, B.W. Determination of ethyl carbamate in wine by solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Am. J. Enol. Vitic.* 2002, 53, 60-63.

Whiton, R.S.; Zoecklein, B.W. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 2000, 51, 379-382.

Wilkes, J.G.; Conte, E.D.; Yongkyoung, K.; Holcomb, M.; Sutherland, J.B.; Miller, D.W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. A review. *J. Chromatogr. A.* 2000, 880, 3-33.

Will, F.; Dietrich, H. Isolation, purification and characterization of neutral polysaccharides from extracted apple juices. *Carbohydr. polym.* 1992, 18, 109-117.

Wu, J.; Yu, X.; Lord, H.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction of inorganic anions based on polypyrrole film. *Analyst.* 2000, 125, 391-394.

Xia, X.R.; Leidy, R.B. Preparation and Characterization of Porous Silica-Coated Multifibers for Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* 2001, 73, 2041-2047.

Yang, X.; Peppard, T. Solid phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1925-1930.

Yang, Y.; Hawthorne, S.B.; Miller, D.J.; Liu, Y.; Lee, M.L. Adsorption versus Absorption of Polychlorinated Biphenyls onto Solid - Phase Microextraction Coatings. *Anal. Chem.* 1998, 70, 1866-1869.

Yoshioka, H.; Aoba, K.; Kashimura, Y. Molecular weight and degree of methoxylation in cell wall polyuronide during softening in pear and apple fruit. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1992, 117, 600-606.

Yu, J.X.; Wu, C.Y.; Xing, J. Development of new solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidues in food. *J. Chromatogr. A.* 2004, 1036, 101-111.

Zarnbonin, C.G.; Quinto, M.; De Vietro, N. Solid-phase microextraction - gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chem.* 2004, 86, 269-274.

Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 1993, 65, 1843-1852.

Zhang, Z.; Pawliszyn, J. Quantitative extraction using an internally cooled solid phase microextraction device. *Anal. Chem.* 1995, 67, 34-43.

Zhang, Z.; Yang, M.J.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction. *Anal. Chem.* 1994, 66, 844-853.

Zhou, Y.; Riesen, R.; Gilpin, C. Comparison of Amberlite XAD-/Freon 11 extraction with liquid/liquid extraction for the determination of wine flavor components. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 818-822.

Zierler, B.; Siegmund, B.; Pfannhauser, W. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 520, 3-11.

Zierler, B.; Siegmund, B.; Pfannhauser, W. Determination of off-flavour compounds in apple juice caused by microorganisms using headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 520, 3-11.