

Enrique
Durán
Guerrero

Tesis Doctoral



Control de los procesos de elaboración, calidad
y trazabilidad del vinagre de Jerez

Control de los procesos de
elaboración, calidad y
trazabilidad del vinagre de
Jerez



Puerto Real, 2008

2008

Enrique Durán Guerrero



Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias

**Control de los procesos de elaboración, calidad
y trazabilidad del Vinagre de Jerez**

Enrique Durán Guerrero

TESIS DOCTORAL
2008

**“Control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad del
Vinagre de Jerez”**

Memoria presentada por el licenciado D. Enrique Durán Guerrero para optar
al grado de Doctor Europeo

Fdo. D. Enrique Durán Guerrero

La presente Tesis Doctoral ha sido codirigida por el Catedrático de
Universidad Dr. D. Carmelo García Barroso y el Profesor Titular de
Universidad Dr. D. Ramón Natera Marín, del Departamento de Analítica de
la Universidad de Cádiz, y cumple con todos los requisitos exigidos por la
legislación vigente.

Fdo. Dr. D. Carmelo García Barroso

Fdo. Dr. D. Ramón Natera Marín

Dr. D. Manuel García Vargas, Catedrático de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACE CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad del Vinagre de Jerez”, constituye la memoria que presenta D. Enrique Durán Guerrero para optar al grado de Doctor Europeo en Química, habiéndose realizado la investigación en el Departamento de Química Analítica de esta Universidad bajo la dirección de los profesores Dr. D. Carmelo García Barroso y Dr. D. Ramón Natera Marín.

Y para que conste y surtan los efectos oportunos, firmo la presente en Puerto Real, a 3 de Diciembre de 2008.

Fdo. Dr. D. Manuel García Vargas

En este momento, estimado lector, tienes entre tus manos el libro donde está, o pudiera estar, la información que buscabas. Porque me imagino, que si has tenido el suficiente valor para abrir este mamotreto de más de 400 páginas, es porque te hacía falta encontrar algún dato y/o resultado relacionado con el vinagre, y no lo has hecho para, simplemente, cotillear los agradecimientos, ¿verdad? Pues bien, antes de que te pongas a buscar esa importante información que necesitas, quiero aprovechar que has empezado por aquí, por esta paginilla aparentemente sin importancia, para decirte que el mérito de este trabajo no sólo me corresponde a mí, aunque sea el que lo firme. Este documento que hoy vas a utilizar, es el fruto del esfuerzo y de la colaboración de muchas personas. Sin ellas, probablemente en este momento, estarías hojeando cualquier otro texto, más o menos interesante, movido por tu insistente y loable interés por el vinagre, pero desde luego no sería esta Tesis Doctoral.

Por ese sencillo y a la vez importante motivo, quiero desde aquí dar mi agradecimiento más sincero a todas esas personas que han hecho posible esta investigación. A todos. A los que me han coordinado, ayudado y apoyado en todo momento. A los que me han preguntado, escuchado y animado día sí y día también. A los que empezaron siendo compañeros y han terminado siendo grandes amigos. A los que me han acompañado durante este largo camino, haciéndolo más fácil con su mera presencia. Vorrei ringraziare anche tutti coloro che mi hanno dimostrato che la vera amicizia non s'intende di lingue. A todos, porque se lo merecen.

Puede que incluso tú, y si has cogido este libro, lo más probable es que así sea, hayas contribuido de una u otra forma a la realización de este trabajo, aunque sea mínimamente, aunque no te lo parezca. Por ello aprovecho ahora que me estás leyendo para decírtelo personalmente: ***¡Muchas gracias de verdad por haber estado ahí!***

Enrique Durán Guerrero

*“...con todo, unas gotas de espíritu de
nitró dulce en agua fría, o un poco de vinagre
aguado, bebiéndolos, son más suaves y más
seguras medicinas”.*

Hipócrates, *El libro de las epidemias*.

A mis padres

A mi hermano

A mi abuela

A Mari

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	7
--------------------------------	---

FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES	13
---	----

I. EL VINAGRE	15
<i>I.1. Definición.....</i>	<i>15</i>
<i>I.2. Tipos de vinagre.....</i>	<i>16</i>
<i>I.3. Métodos de elaboración de vinagres.....</i>	<i>17</i>
I.3.1. Métodos tradicionales de elaboración de vinagres.....	17
I.3.2. Métodos industriales de elaboración de vinagres.....	19
<i>I.4. El Vinagre de Jerez.</i>	<i>23</i>
<i>I.5. El Vinagre Balsámico Tradicional de Módena y Reggio-Emilia.</i>	<i>28</i>
<i>I.6. Compuestos volátiles del vinagre.....</i>	<i>30</i>
I.6.1. Perfil de algunos de los volátiles mayoritarios en el vinagre.....	30
I.6.2. Antecedentes bibliográficos de la cromatografía gaseosa aplicada a los compuestos volátiles del vinagre.	33
<i>I.7. Bibliografía</i>	<i>37</i>

II. TÉCNICAS ANALÍTICAS DE EXTRACCIÓN EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DEL AROMA DEL VINAGRE Y OTROS PRODUCTOS ENOLÓGICOS.	43
<i>II.1. Introducción.....</i>	<i>43</i>
<i>II.2. Extracción en fase sólida (SPE).....</i>	<i>45</i>
II.2.1. Aplicaciones de la SPE al estudio del aroma del vinagre.....	47
II.2.2. Aplicaciones de la SPE al estudio del aroma del vino.....	48
II.2.3. Aplicaciones de la SPE al estudio de los aromas indeseables en vinos.	51
<i>II.3. Microextracción en fase sólida (SPME).</i>	<i>56</i>
II.3.1. Aplicaciones de la SPME al estudio del aroma del vinagre.	60
II.3.2. Aplicaciones de la SPME al estudio del aroma del vino	61
II.3.3. Aplicaciones de la SPME al estudio de los aromas indeseables en vinos.....	69
II.3.4. Aplicaciones de la SPME al estudio del aroma de otros productos.	74
<i>II.4. Extracción por absorción en barra agitadora (SBSE).....</i>	<i>75</i>
II.4.1. Aplicaciones de la SBSE al estudio del aroma del vinagre.....	79
II.4.2. Aplicaciones de la SBSE al estudio del aroma de otros productos.	82
<i>II.5. Bibliografía.....</i>	<i>89</i>

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	99
--	----

III. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR ABSORCIÓN EN BARRA AGITADORA (SBSE) APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINAGRES.	101
<i>III.1. Introducción.</i>	<i>101</i>
<i>III.2. Materiales y métodos.....</i>	<i>103</i>
III.2.1. Muestras de vinagre.	103
III.2.2. Patrones y reactivos.....	104
III.2.3. Preparación de las muestras.	104

III.2.4. Instrumental.....	104
III.2.5. Diseño de experimentos.....	106
III.3. Resultados y discusión.....	108
III.3.1. Optimización del método de análisis.....	108
III.3.1.1. Optimización de las condiciones de extracción.....	108
III.3.1.2. Optimización de las condiciones de desorción.....	114
III.3.3. Estudio comparativo entre la SPME y la SBSE.....	118
III.3.4. Características analíticas.....	120
III.3.4.1. Calibración. Linealidad.....	120
III.3.4.2. Límites de detección y repetibilidad.....	122
III.4. Conclusiones.....	122
III.5. Bibliografía.....	123

IV. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINAGRES MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR ABSORCIÓN EN BARRA AGITADORA (SBSE) Y COMPARACIÓN CON LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).....

IV. Introducción.....	125
IV.2. Experimental.....	125
IV.2.1. Muestras de vinagre.....	125
IV.2.2. Reactivos.....	126
IV.2.3. SPME.....	126
IV.2.3.1. Preparación de muestra.....	126
IV.2.3.2. Condiciones cromatográficas.....	127
IV.2.4. SBSE.....	128
IV.2.4.1. Preparación de muestra.....	128
IV.2.4.2. Instrumental.....	128
IV.3. Resultados y discusión.....	128
IV.3.1. Características analíticas.....	129
IV.3.1.1. Calibración. Linealidad.....	130
IV.3.1.2. Límites de detección, límites de cuantificación y recuperación.....	132
IV.3.1.3. Repetibilidad y reproducibilidad.....	136
IV.3.1.4. Efecto matriz.....	136
IV.3.2. Determinación de compuestos volátiles en vinagres.....	138
IV.3.3. Comparación entre SBSE y SPME para el análisis de compuestos volátiles en vinagre.....	142
IV.4. Conclusiones.....	142
IV.5. Bibliografía.....	144

V. OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR ABSORCIÓN EN BARRA AGITADORA (SBSE) APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN VINAGRES.....

V.1. Introducción.....	147
V.2. Experimental.....	150
V.2.1. Muestras de vinagre.....	150
V.2.2. Reactivos.....	151
V.2.3. Preparación de muestra.....	151
V.2.4. Instrumental.....	152
V.2.5. Diseño experimental.....	155
V.3. Resultados y discusión.....	156
V.3.1. Estudio previo.....	156

V.3.2. Optimización de las condiciones de extracción	157
V.3.2.1. Barrido mediante un diseño factorial 2 ⁴	157
V.3.2.2. Optimización mediante un diseño central compuesto	158
V.3.3. Características analíticas	162
V.3.3.1. Calibración y linealidad	162
V.3.3.2. Límites de detección y cuantificación y recuperación	162
V.3.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad	164
V.3.4. Determinación de residuos de pesticida en vinagres	165
V.4. Conclusiones	166
V.5. Bibliografía	168

VI. MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINAGRES BALSÁMICOS TRADICIONALES..... 171

<i>VI.1. Introducción</i>	171
<i>VI.2. Experimental</i>	172
VI.2.1. Muestras de vinagre	172
VI.2.2. Reactivos químicos	173
VI.2.3. Preparación de muestra	173
VI.2.4. Instrumentación	174
VI.2.5. Diseño experimental	175
<i>VI.3. Resultados y discusión</i>	176
VI.3.1. Selección del cartucho	176
VI.3.2. Optimización de las condiciones de extracción	177
VI.3.2.1. Barrido mediante un diseño factorial 2 ⁴⁺¹	177
VI.3.2.2. Optimización mediante un diseño central compuesto	178
VI.3.3. Características analíticas	181
VI.3.3.1. Calibración. Linealidad	181
VI.3.3.2. Límites de detección y cuantificación	183
VI.3.3.3. Precisión. Recuperación, repetibilidad y reproducibilidad	183
VI.3.4. Determinación de compuestos volátiles en vinagre balsámico tradicional	186
<i>VI.4. Conclusiones</i>	188
<i>VI.5. Bibliografía</i>	189

APLICACIONES A LOS PROCESOS DE ELABORACIÓN 191

VII. SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE ACETIFICACIÓN DE UN VINAGRE DE JEREZ MEDIANTE SBSE-GC-MS E IR-MEDIO 193

<i>VII.1. Introducción</i>	193
<i>VII.2. Materiales y métodos</i>	196
VII.2.1. Condiciones de la fermentación	196
VII.2.2. Métodos de análisis	197
<i>VII.3. Resultados y discusión</i>	200
VII.3.1. Determinación de volátiles por SBSE-GC-MS	200
VII.3.2. Determinación de la evolución de los componentes aromáticos durante la acetificación	204
VII.3.3. Establecimiento de la correlación entre diferentes componentes aromáticos y el espectro de IR	208
VII.3.3.1. Estudios previos	208
VII.3.3.2. Estudio de correlación	210
<i>VII.4. Conclusiones</i>	215

<i>VII.5. Bibliografía</i>	215
VIII. DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINAGRES PROCEDENTES DE DISTINTAS MATERIAS PRIMAS.....	219
<i>VIII.1. Introducción</i>	219
<i>VIII.2. Materiales y métodos</i>	222
VIII.2.1. Muestras de vinagres	222
VIII.2.2. Compuestos volátiles	222
VIII.2.3. Compuestos polifenólicos	223
VIII.2.4. Ácidos orgánicos	224
VIII.2.5. Infrarrojo medio	224
VIII.2.6. Técnicas multivariantes.....	225
<i>VIII.3. Resultados y discusión</i>	226
VIII.3.1. FT-IR	226
VIII.3.1.1. Análisis de componentes principales. PCA.....	227
VIII.3.1.2. Discriminación. PLS-DA y SLDA	230
VIII.3.2. Parámetros analíticos	232
VIII.3.2.1. Análisis de componentes principales. PCA.....	232
VIII.3.2.2. Discriminación. PLS y SLDA.	233
<i>VIII.4. Conclusiones</i>	235
<i>VIII.5. Bibliografía</i>	236
IX. ESTUDIO DE LA TRAZABILIDAD DE LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN LA PRODUCCIÓN DEL VINAGRE DE JEREZ	239
<i>IX.1. Introducción</i>	239
<i>IX.2. Materiales y métodos</i>	242
IX.2.1. Reactivos	242
IX.2.2. Muestreo y condiciones de fermentación	243
IX.2.3. Preparación de muestra	244
IX.2.4. Equipamiento	245
IX.2.5. Diseño de experimentos.....	246
<i>IX.3. Resultados y discusión</i>	247
IX.3.1. Desarrollo del método de extracción	247
IX.3.1.1. Extracción asistida por ultrasonidos. Estudios previos	248
IX.3.1.2. Método de extracción asistida por ultrasonidos. Optimización de las condiciones de extracción.....	249
IX.3.1.3. Extracción asistida por microondas. Estudios previos.....	251
IX.3.1.4. Método de extracción asistida por microondas. Optimización de las condiciones de extracción.....	252
IX.3.1.5. Comparación entre los métodos optimizados	254
IX.3.2. Características analíticas.....	255
IX.3.2.1. Calibración, linealidad y límites de detección y cuantificación	255
IX.3.2.2. Precisión. Recuperación y repetibilidad.....	257
IX.3.2.3. Influencia del proceso de maduración.....	259
IX.3.3. Seguimiento de los pesticidas durante la elaboración de vinagre de Jerez	261
<i>IX.4. Conclusiones</i>	263
<i>IX.5. Bibliografía</i>	264
X. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE VINAGRES DE CALIDAD CON INDICACIÓN GEOGRÁFICA EUROPEA PROTEGIDA MEDIANTE GC-MS	267
<i>X.1. Introducción</i>	267

<i>X.2. Materiales y métodos</i>	269
X.2.1. Muestras	269
X.2.2. Extracción de las muestras	270
X.2.3. GC/MS.....	270
X.2.4. Análisis estadístico	271
<i>X.3. Resultados y discusión</i>	271
X.3.1. Compuestos volátiles	271
X.3.2. Análisis Factorial.....	288
<i>X.4. Bibliografía</i>	289
XI. FORMACIÓN, ENTRENAMIENTO Y VALIDACIÓN DEL PANEL DE CATA PARA LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE VINAGRES.....	293
<i>XI.1. Introducción</i>	293
<i>XI.2. Selección</i>	294
<i>XI.3. Entrenamiento</i>	296
<i>XI.4. Cuestionarios empleados</i>	299
XII. ESTUDIOS DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO EMPLEANDO MICROOXIGENACIÓN Y VIRUTAS, EN LA PRODUCCIÓN DE UN VINAGRE DE JEREZ.....	305
<i>XII.1. Introducción</i>	305
<i>XII.2. Materiales y métodos</i>	306
XII.2.1. Diseño de las experiencias	306
XII.2.2. Compuestos volátiles.....	308
XII.2.3. Compuestos polifenólicos	309
XII.2.4. Análisis del color	310
XII.2.5. Análisis sensorial	310
XII.2.6. Análisis estadístico	312
<i>XII.3. Resultados y discusión</i>	312
XII.3.1. Compuestos volátiles.....	312
XII.3.2. Compuestos polifenólicos	315
XII.3.3. Análisis del color	317
XII.3.4. Análisis sensorial	317
XII.3.4.1. Pruebas discriminativas.....	317
XII.3.4.2. Pruebas descriptivas	321
XII.3.4.3. Análisis de componentes principales	325
<i>XII.5. Conclusiones</i>	328
<i>XII.6. Bibliografía</i>	328
<i>XII.7. Anexos</i>	331
CONCLUSIONES.....	333
ENGLISH SUMMARY	341
ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS	381

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde tiempos remotos, siendo empleado como condimento y como conservante, además de ingrediente en remedios simples para hombres y animales. El vinagre es un producto cuyo valor y apreciación por parte de los consumidores está aumentando los últimos tiempos. El objetivo de las empresas productoras de vinagres es obtener vinagres de alta calidad, empleando para ello toda la tecnología posible. La importancia de la producción de vinagres es tal que están surgiendo organismos reguladores de estos productos. Un ejemplo de esto es la aparición de la denominación de origen del vinagre de Jerez. Esta denominación se refiere a vinagres obtenidos exclusivamente a partir de vinos producidos con uvas cultivadas en la zona de producción de las denominaciones de origen “Jerez-Xérès-Sherry” y “Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda” que presenten una graduación alcohólica mínima de 9.5° y una acidez total mínima de 2.5 g/l expresados como tartárico.

Hoy en día, se emplean dos métodos diferentes de acetificación. Estos métodos producen vinagres muy diferentes desde el punto de vista químico y organoléptico: los vinagres producidos empleando un método tradicional de acetificación lento con cultivo superficial; y vinagres obtenidos a partir de una acetificación rápida en biorreactores específicos con cultivo sumergido.

El vinagre de Jerez se envejece empleando tanto un sistema estático llamado “añadas”, como mediante un sistema dinámico característico llamado “criaderas y solera”, siendo este último el más difundido y generalizado.

Hasta hace unos pocos años, el vinagre de Jerez había sido considerado simplemente como un producto alimentario de segunda fila. Sin embargo, hoy día es un producto altamente apreciado, con una gran calidad, al mismo nivel que los brandies y vinos típicos de esta región. Por tanto, los productores demandan nuevas técnicas capaces de determinar los parámetros adecuados que controlen los procesos de elaboración, que mejoren la calidad del producto final, y, además, que describan y diferencien este vinagre especial.

Debido a la diversidad de los vinagres presentes en el mercado y a la demanda creciente, se está considerando necesaria la investigación de métodos analíticos fiables para establecer criterios para la determinación de la calidad y el origen, ya que el objetivo de la autenticación de este producto permanece todavía como una asignatura sin resolver. La calidad del vinagre está influenciada fuertemente por los compuestos del aroma, así como por otros componentes como los polifenoles o los ácidos orgánicos. Sus propiedades químicas y organolépticas vienen determinadas por el sistema de acetificación, por la materia prima empleada y, en algunos casos, por el envejecimiento en madera. Las diferentes materias primas empleadas como sustratos y los procedimientos tecnológicos que pueden ser usados, conducen a una gran variedad de productos de diferentes calidades y propiedades organolépticas. Además, nuevas técnicas espectroscópicas, como el FT-IR, son capaces de proporcionar información en relación a todas estas características mencionadas.

Por otra parte, desde 2005 es necesario poseer un sistema de trazabilidad en la producción de alimentos, el cual sea capaz además de garantizar la seguridad alimentaria, de garantizar las características diferenciadoras de la alta calidad del vinagre de Jerez.

A pesar de la tendencia actual hacia el uso de una agricultura ecológica, todavía es necesario emplear productos fitosanitarios con el objetivo de garantizar muchos cultivos, tanto en calidad como en cantidad. Esta calidad, obviamente obliga a asegurar la no presencia de residuos químicos en el producto final. Esta tendencia se ha observado también en el vinagre y una cantidad cada vez mayor de productos con la etiqueta de “ecológico” aparece en el mercado.

Hoy día existen muchos productos recomendados para el control de las plagas y enfermedades de la uva vínica, los cuales en una u otra manera pueden persistir, durante las diferentes etapas de producción, hasta el vinagre final. Cuando se realiza un tratamiento fitosanitario, una determinada cantidad de sustancia permanece en la planta, a la que se llama depósito de pesticida. Esta cantidad de pesticida disminuye progresivamente con el tiempo hasta el momento de la recolección, cuando solamente aparece el residuo.

Por tanto, no sólo por la influencia que pudiera tener en las propiedades organolépticas del vinagre, o por el riesgo que pudiera suponer hacia la salud pública una alta cantidad de estos residuos, sino también por su implicación en la obtención de la denominación de “vinagre ecológico”, cada vez más apreciada y demandada por el consumidor, es interesante poseer métodos sensibles capaces de determinar los niveles de los productos fitosanitarios en vinagres, los cuales permitan el control de la trazabilidad del producto.

Por tanto, los objetivos de la presente tesis son los siguientes:

- 1) Desarrollo de métodos analíticos para el control de los parámetros relacionados con la elaboración, así como los

indicadores de la calidad y los implicados en la trazabilidad, del vinagre de Jerez.

- 2) Estudio del comportamiento de parámetros relacionados con la elaboración del vinagre (acetificación) y monitorización del proceso, así como ensayos de mejoras del mismo.
- 3) Caracterización del sistema tradicional de envejecimiento del vinagre de Jerez con determinación de la vejez, así como ensayos alternativos con vistas a acelerar los procesos, manteniendo la calidad (empleo de virutas, microoxigenación, etc.).
- 4) Control de la trazabilidad (de la cepa a la mesa) en la elaboración de vinagres de Jerez, controlando la materia prima, los sistemas de elaboración y envejecimiento, con vistas a garantizar el origen, la diferenciación y calidad y el caso particular de los vinagres ecológicos.
- 5) Formación de un panel de análisis sensorial entrenado para el análisis de vinagres, permitiendo la evaluación organoléptica de este tipo de producto.
- 6) Comparación del vinagre de Jerez con otros vinagres de alta calidad, como el vinagre balsámico tradicional de Módena, en términos del perfil aromático, teniendo en cuenta sus procesos de envejecimiento similares.

FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y
ANTECEDENTES



I EL VINAGRE.

1.1. Definición.

La palabra vinagre procede etimológicamente del latín “*vinum acre*”, de la que deriva la locución francesa “*vin aigre*” equivalente al vino agrio, pero en esta acepción su procedencia no queda relegada al vino, sino que cualquier sustrato amiláceo es susceptible de ser utilizado.

Según la Reglamentación Técnico Sanitaria correspondiente [1] con la denominación genérica de vinagre se designa: “el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación, alcohólica y acética de productos de origen agrario que contengan azúcares o sustancias amiláceas, con una riqueza mínima de 50 g/l”. Se entiende por grado de acidez de los vinagres su acidez total expresada en gramos de ácido acético por 100 ml, a 20°C.

En el ámbito de la Unión Europea se entiende por vinagre a aquél que se obtiene exclusivamente a través de la fermentación acética del vino, que presenta un grado de acidez total no inferior a 60 g/l, expresado en ácido acético. Se permite añadir un calificativo relativo al origen vinícola en caso de que el vinagre haya sido elaborado a partir del vino de la denominación en cuestión, apropiado para el consumo.

Según la FAO/OMS, “el vinagre es un líquido apto para el consumo humano, que es producido exclusivamente a partir de materias primas de origen agrícola que contengan almidones y/o azúcares, por un doble proceso de fermentación, alcohólica y acética”. Pueden contener cantidades

determinadas de ácido acético, y otros ingredientes opcionales (hierbas, especias, sal), lo que será regulado por la Comisión del Codex Alimentarius, según el tipo de ingrediente, al objeto de obtener un aroma peculiar característico de cada tipo de vinagre.

1.2. Tipos de vinagre.

Cualquier sustrato azucarado o amiláceo puede ser utilizado en la elaboración de vinagres. Así mismo, los métodos de elaboración serán diferentes. Por tanto, los vinagres se pueden clasificar en función del tipo de sustrato empleado o del método usado en su elaboración.

En nuestro país, el tipo más común de vinagre, es el de vino, pero en aquellos países que no disponen de un clima mediterráneo o que sea propicio al cultivo de la vid, como los países anglosajones, escandinavos o asiáticos, se elaboran, preferencialmente, otros tipos de vinagres. Así, vinagres de vinos de frutas (manzana, sidra, piña, plátano, melón, dátil entre otras), vinagres de miel y de suero de leche, de cereales, de arroz y sake, de cerveza y de alcohol. Hasta la legislación española de 1993, el término *vinagre* era sinónimo, sin más calificativo, de *vinagre vínico*, el único que reglamentariamente estaba autorizado en España, según la reglamentación de 1973 [2].

El *vinagre de sidra*, astringente y con olor frutáceo, se obtiene de la fermentación alcohólica del zumo de manzana o sidra procedente de zumo concentrado; el mayor productor europeo es el Reino Unido, aunque también es usual en Estados Unidos. El *vinagre de malta* y el *vinagre destilado de malta* tienen un gran consumo en el Reino Unido, de tal forma que son exportadores del citado producto a Estados Unidos; el sustrato es malta cervecera, añadida de arroz o maíz.

En el *vinagre de cerveza* se agrega malta concentrada, y tiene un sabor algo amargo. El *vinagre de arroz* o de *sake* (aguardiente de arroz) se elabora en Japón, China y otros países asiáticos. El *vinagre de alcohol* se elabora por fermentación acética de una disolución acuosa de etanol (este alcohol procede de la fermentación alcohólicas de materias agrícolas, seguido de destilación). El llamado “*distilled vinegar*”, de Escocia, se fabrica a partir del vinagre de malta madura, que se somete a destilación adecuada y es bastante útil, por su grado de acidez, en la industria conservera. El vinagre que en Estados Unidos se conoce como “*White distilled vinegar*”, se elabora a partir de alcohol de cualquier procedencia, incluso sintético, utilizando normalmente como agente desnaturizante acetato de etilo.

El *vinagre sintético* o artificial, se elabora con disolución acuosa diluída de ácido acético, añadido de aromatizantes, que puede ser vinagre vínico, destilado de vinos fermentados; el ácido acético es no-biogénico, y se podría obtener a partir de acetileno, o del ácido piroleñoso de la madera [3].

1.3. Métodos de elaboración de vinagres.

1.3.1. Métodos tradicionales de elaboración de vinagres.

Mucho antes de conocerse los microorganismos que dan lugar al vinagre, ya se fabricaban vinagres en diferentes países. Recetas tan antiguas como la de Columela* (“para hacer vinagre, echar en 48 sextarios de vino torcido una libra de levadura, tres onzas de higos secos y un sextario de sal, todo molido y desleído antes en un cuartario de miel clara”), muestran que la

* Columela, nacido en Cádiz en el 3 a.C. bajo el reinado de Augusto, fue un escritor agrónomo romano, autor del Primer Tratado de Agricultura en latín.

fabricación de vinagre no se dejaba a la evolución espontánea del vino que comenzaba a agriarse, y que se procuraban todos los ingredientes que son necesarios para la acetificación, esto es: etanol del vino, azúcares de los higos y la miel, sal que previene el desarrollo de otros microorganismos que no sean las bacterias acéticas.

Columela da también la receta para hacer vinagre en países donde escasea el vino, utilizando “higos blancos muy maduros” que se dejan fermentar y agriar dando un vinagre “muy fuerte de primera calidad” [4].

Han sido varios los métodos usados para la fabricación o elaboración tradicional de vinagres, empleándose una *fermentación superficial*, en la que las bacterias acéticas se sitúan en la interfase líquido/gas.

El método luxemburgués, o **proceso Michaelis**, consiste, básicamente, en la utilización de una cuba o tonel giratorio, colocada sobre un caballete y provista en el interior de un falso fondo agujereado, y relleno de virutas de madera. El vino se introduce en la barrica que, periódicamente se hace girar, hasta que la acetificación se ha completado [3].

El método conocido como francés, o **método orleanense** consiste, en términos generales, en una oxidación lenta del material alcohólico para acetificar, en diversos toneles rellenos hasta un tercio de su capacidad de vinagre de vino, que ejerce de “madre”. En toneles de 200 a 400 litros de capacidad, se hace llegar el vino filtrado y una parte de vinagre de alta acidez, al objeto de impedir el desarrollo de bacterias indeseables. El vino se introduce, y se recoge el vinagre por un orificio situado en la parte superior del tonel, que se denomina el “ojo”. Por otro orificio, denominado “botana”, sale el aire cuando se cambia la vasija. Se disponen unos 150 litros de vino,

y cada semana se extrae de la base de la cuba una cantidad conocida y constante de vinagre, cercana a los 10 litros, a la vez que se introduce igual volumen de vino, hasta un nivel de 5 cm del “ojo”; y así sucesivamente, hasta el agotamiento de la masa. La fermentación tiene lugar de modo continuo y lento, y la temperatura óptima debe ser de 25-30°C. Normalmente, el proceso de acetificación se completa en unos 15 días [3].

Aunque, actualmente, estos métodos tradicionales han sido reemplazados en gran medida por los métodos industriales de elaboración de vinagres, todavía hoy se siguen realizando investigaciones para entender con mayor claridad los fenómenos que se llevan a cabo durante la fermentación superficial [5, 6], debido a la gran calidad del producto obtenido de esta forma.

1.3.2. Métodos industriales de elaboración de vinagres.

Los actuales métodos industriales de elaboración de vinagre se basan, esencialmente, en el aumento de la superficie de contacto entre el líquido y el aire. Se puede hacer una diferenciación entre las dos formas de acetificación empleadas usualmente:

- *Fermentación lenta o en superficie*, situándose las bacterias sobre virutas de madera.
- *Fermentación rápida o de cultivo sumergido*, con las bacterias sumergidas libremente en el seno del líquido a fermentar.

El proceso conocido como **método de Schützenbach**, pertenece al primer grupo, es un *método lento*, que consiste en el empleo de toneles o generadores verticales, de madera de encina, normalmente con doble fondo. Sobre el primer fondo, agujereado, se disponen una serie de capas de virutas

de madera, de encina o haya, impregnadas de vinagre de buena calidad. Sobre el borde superior lleva un diafragma perforado, con los orificios obturados con algodón. El proceso consiste en hacer percolar, a períodos regulares, el vino desde la parte superior a la inferior, donde experimenta un íntimo contacto con las virutas de madera impregnadas de la acetobacteria, a la vez que burbujea el aire que existe entre las virutas. El vinagre, ya obtenido, se extrae por la parte inferior. El sistema se continúa, volviendo a reconducir, mediante bombeo adecuado desde la parte inferior a la superior, el vino en fase de acetificación, hasta la transformación completa en vinagre. Se pueden emplear barriles de roble giratorios, parcialmente llenos de virutas, con lo que se consigue una mejor aireación. Un ciclo completo de elaboración dura cerca de una semana, originándose de 90 a 100 hl de vinagre de 7-8 grados acéticos. Sobre la pared externa del tonel de acetificación se han practicado orificios, al objeto de dejar pasar el aire, y se introducen termómetros adecuados para el control de la temperatura en el interior del tonel. Junto al acetificador se instala un cambiador de calor. Los vinagres que se obtienen con este proceso son suficientemente lípidos y brillantes, y los constituyentes volátiles no experimentan desequilibrios dignos de mención, dada la lentitud del proceso. Es necesario tener en cuenta la remoción del material poroso periódicamente, y el lavado cuidadoso de las virutas.

Dentro de los *métodos rápidos*, y desde principios de los años treinta del siglo XX, en que se patentó, el acetificador más ampliamente utilizado es el de **tipo Frings**. El primer modelo se trataba de un tanque cilíndrico lleno de virutas de madera de haya, con orificios ajustables automáticamente para la entrada de aire. El líquido en fermentación, que se extraía por el fondo, se hacía recircular mediante una bomba. Los conductos estaban rodeados por una “camisa de agua”, para disipar el calor originado durante el proceso de

reacciones exotérmicas, y conseguir mantener una temperatura óptima de 30°C.

El método de fermentación sumergida, o rápida, se basa en la presencia de un cultivo de bacterias sumergidas libremente en el seno del líquido a fermentar, en el que constantemente se introduce aire (sólo, o enriquecido con oxígeno) en condiciones que permitan la máxima transferencia posible, desde la fase gaseosa a la fase líquida. Es decir, en este caso no existe soporte alguno para las bacterias. A diferencia del procedimiento en superficie, las acetobacterias se encuentran inmersas en el líquido de fermentación, sin ningún soporte, pero en íntimo contacto con el oxígeno del aire [7]. Desde el punto de vista tecnológico, este método no pudo tener vigencia hasta mediados del siglo pasado [8]. Los acetificadores son de una concepción bastante simple, automatizados, y están comercializados, como el Frings de Bonn (“Acetator”) o el Bourgeois de Ginebra (“Acetomatic”). El acetificador está constituido por un tonel de acero inoxidable, de capacidad entre 100 y 300 hl [9]. Se sostienen sobre una base de acero inoxidable, y en su parte inferior llevan una turbina de aireación. Presentan una producción diaria de vinagre de 30 a 120 hl, con una acidez que puede llegar hasta 9 grados.

Mientras que en el proceso de fermentación en superficie se podrían lograr rendimientos de alrededor del 90%, en el proceso de cultivo sumergido, y debido a una cinética más favorable, los rendimientos pueden alcanzar el 95%. Mediante cambiador de calor adecuado, se logra mantener la temperatura alrededor del valor óptimo de 30°C.

En la fermentación mediante cultivo sumergido, el reactor puede operar de tres modos diferentes: en discontinuo, en semi-continuo, o en continuo. La elección de uno u otro modo depende de muchos factores, pero,

generalmente, el sistema discontinuo es el más ampliamente utilizado. Entre las razones, podemos destacar que permite que parte de la biomasa producida, se pueda utilizar como “madre” en el siguiente ciclo. Por otra parte, se pueden controlar los cambios producidos en las bacterias, debidos a las operaciones de carga y descarga del depósito, utilizando condiciones operativas, con vistas a mantener dentro de unos límites aceptables las concentraciones de ácido acético y etanol. Esto facilita la selección de las bacterias más adecuadas a cada tipo de medio empleado [10].

Los fermentadores industriales de cultivo sumergido presentan una desventaja, y es que se producen elevadas pérdidas de compuestos volátiles, debido a la continua aireación a la que se ven sometidos. Por ello, De Ory y col. [11], propusieron una modificación consistente en el uso de un fermentador provisto de un sistema cerrado de recirculación de gas, que reducía al 0% las pérdidas de volátiles debidas a la evaporación.

Con el fin de optimizar el proceso de acetificación en cultivo sumergido, se han realizado recientemente varios estudios. García-García y col. [12] estudiaron la velocidad de acetificación a partir de los cambios producidos en la concentración de etanol, determinados de manera “on-line”. Así, se consiguió calcular de manera precisa, la actividad bacteriana durante el proceso de acetificación. Se podía ver de este modo, cómo afectaban a dicha actividad, los cambios en las condiciones operacionales, y por tanto, al proceso de acetificación. Maestre y col. [13] se encargaron de estudiar, durante el proceso de acetificación por el método sumergido, los cambios en la composición aminoacídica, principal fuente de nitrógeno para las bacterias. Garrido-Vidal y col. [14], mediante aproximaciones quimiométricas, estudiaron la influencia de otros múltiples factores en este tipo de acetificación. También se han empleado técnicas espectroscópicas como el IR cercano, para estudiar la cinética de la fermentación [15]. Del

mismo modo, Sellmer [16] y Emde [17], abordan también, el tema de la fermentación acética en cultivo sumergido, y Yanagida [18] lo emplea para la producción de vinagres de arroz.

El vinagre elaborado con el sistema de fermentación rápida aparece algo turbio, con características químicas y organolépticas de menor aprecio, con respecto al vinagre obtenido a través de los métodos lentos. Esto se explica por la perturbación originada como consecuencia de la introducción de gran cantidad de aire a presión. Ofrece un buen rendimiento industrial y la automatización es efectiva, sin embargo se pueden modificar o destruir algunos componentes, e incluso inhibirse los procesos de esterificación por acción de enzimas específicas [3].

1.4. El Vinagre de Jerez.

Los orígenes de la viticultura en Jerez se remontan al año 1100 a.C., cuando ya los asentamientos fenicios de *Xera* (Jerez) cultivaban viñas, y sus vinos fueron distribuidos por todo el Mediterráneo. Puede afirmarse que el Vinagre de Jerez existe desde que existe el propio Vino de Jerez. Las primeras referencias escritas que tenemos del Vinagre de Jerez se deben a Columela, en el siglo I [19].

La zona de producción de las Denominaciones de Origen *Jerez-Xérès-Sherry*, *Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda* y *Vinagre de Jerez* se denomina comúnmente *Marco de Jerez*. Se extiende a lo largo de ocho municipios de la provincia de Cádiz (Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María, Sanlúcar de Barrameda, Chiclana, Chipiona, Puerto Real, Rota y Trebujena) y un municipio de la provincia de Sevilla (Lebrija) [20].

La zona de crianza está restringida a Jerez de la Frontera, Sanlúcar de Barrameda, y El Puerto de Santa María. Únicamente las bodegas localizadas en estos municipios podrán realizar el envejecimiento y expedición de los vinagres calificados por la D.O. Vinagre de Jerez.



Figura I.1. Etiqueta de la Denominación de Origen Vinagre de Jerez

El Marco de Jerez tiene unas características climatológicas singulares: 300 días de sol al año, inviernos suaves, veranos calurosos, una pluviometría superior a 600 mm/año y dos vientos dominantes: levante y poniente, que favorecen la maduración de la uva y suavizan las temperaturas veraniegas.

El suelo predominante en el Marco es la tierra albariza, que recibe su nombre de su color claro, debido a su carácter calizo. Tiene un alto poder retentivo de la humedad, almacenando la lluvia caída en invierno y primavera, para nutrir la cepa en los meses secos.

Las variedades autorizadas para elaborar el Vinagre de Jerez son la *Palomino de Jerez*, *Palomino Fino*, *Moscatel* y *Pedro Ximénez*, todas ellas blancas. La *Palomino* es la variedad más característica del Marco de Jerez,

con más del 95% de la superficie, y está especialmente adaptada a sus condiciones edafoclimáticas.

El vinagre es obtenido exclusivamente de vinos adecuados de la zona, es decir, vinos procedentes de uvas vendimiadas de viñas inscritas en las citadas Denominaciones [20].

El proceso de elaboración del Vinagre de Jerez consiste básicamente en una fermentación acética y un envejecimiento en botas (barricas) que hayan contenido previamente vinos de Jerez, es lo que se conoce como botas “envinadas”.

El vino se transforma en vinagre mediante un proceso natural de fermentación acética en depósitos de acero inoxidable, en el que las bacterias *Acetobacter* oxidan el alcohol hasta convertirlo en ácido acético y agua. Se permite el empleo de nutrientes como fosfato amónico, sódico o potásico y la adición de malta o levadura para favorecer la acetificación, así como la oxidación forzada por el aire y oxígeno puro. Posteriormente el vinagre se somete a clarificación y filtración para eliminar impurezas.

El envejecimiento del Vinagre de Jerez es el más tradicional y antiguo de los que se conocen en Andalucía, y se realiza principalmente mediante el sistema de criaderas y solera (figura I.2). Este sistema está compuesto por una serie indeterminada de botas, agrupadas en filas horizontales o escalas cuyo número puede oscilar (en el caso del vinagre) entre tres y cinco. La bota tradicional para el envejecimiento de Vinagre de Jerez es la bota Jerezana de 500 litros, fabricada de roble americano y “envinada” previamente con Vino de Jerez.

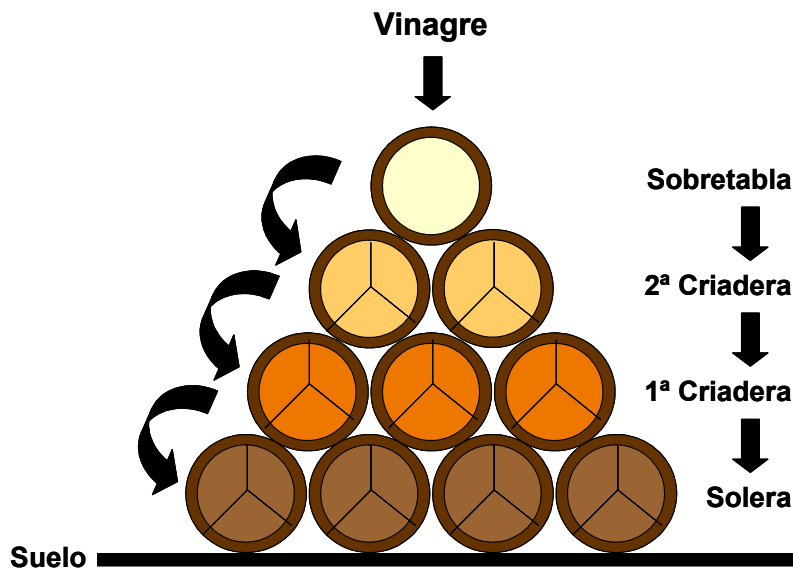


Figura I.2. Sistema de envejecimiento de criaderas y solera.

La escala que está a ras del suelo recibe el nombre de “solera”, sobre ella se encuentra la primera criadera, sobre la cual se sitúa la segunda y así sucesivamente. La edad del vinagre que contienen las botas, aumenta conforme descendemos en el sistema, siendo la solera la de mayor envejecimiento.

El vinagre acabado se obtiene de la solera, no pudiendo exceder la cantidad que se saca de la bota en un tercio del contenido de la misma. Esta cantidad se repone con el contenido de la primera criadera. Ésta a su vez se nutre del de la segunda y así sucesivamente, ingresando el sustrato de partida en el sistema por la criadera superior. Estas operaciones se llaman “sacas” y “rocíos”. La periodicidad con que se realizan es variable según la bodega en cuestión. El vinagre que se saca de una escala se reparte entre las botas de la escala inferior. Dado el número de botas de un sistema de soleras y la

periodicidad de la saca, se tiene una gran homogeneización en todo el sistema. Así, el vinagre interacciona lentamente con los componentes de la bota, por lo que adquiere color y aroma, ganando en madurez y complejidad. Durante el proceso de envejecimiento en madera, se producen diferentes fenómenos [21]:

- pérdidas de agua a través de los poros de la madera y, consecuentemente, concentración de compuestos químicos
- extracción de algunos compuestos de la madera
- reacciones de condensación
- oxidación química.

Este sistema dinámico presenta la ventaja añadida de la mejor transferencia de oxígeno, que aumenta la concentración de éste, en comparación con el clásico método de Orléans.

Considerando las características de este peculiar envejecimiento, resulta muy difícil calcular la edad exacta de un vinagre, por lo que se suele hablar de edad aproximada. En función del tiempo de envejecimiento, se distinguen: Vinagre de Jerez (un mínimo de 6 meses), Vinagre de Jerez Reserva (mínimo de 2 años) y el reciente Vinagre de Jerez Gran Reserva (mínimo de 10 años).

Aunque el Consejo Regulador admite el sistema de envejecimiento por “añadas”, en el que el vinagre permanece siempre en la misma barrica de envejecimiento de forma estática, el sistema dinámico de criaderas y solera está mucho más extendido.

El resultado de este singular proceso de elaboración, es un vinagre fuerte de color caoba, características que adquiere fundamentalmente durante

el envejecimiento. Al ser un proceso artesanal, el reglamento permite un contenido en alcohol residual de hasta un 3% en volumen y un contenido mínimo de extracto seco de 1.3 g/l por cada grado acético. La acidez mínima exigida es de 70 g/l (7% en volumen) [20].

1.5. El vinagre Balsámico Tradicional de Módena y Reggio-Emilia.

El Vinagre Balsámico Tradicional de Modena (VBTM) y el Vinagre Balsámico Tradicional de Reggio-Emilia (VBTRE) son vinagres italianos que proceden de la región de la Emilia-Romagna, diferenciándose casi exclusivamente por su área de producción y por las variedades de uva empleadas para obtener el mosto de partida. Consisten en una salsa oscura y siruposa, donde las notas amargas (características de los vinagres de vino convencionales) están bien equilibradas por un sabor dulce de fondo derivado del mosto no fermentado inicial. De manera breve, para el VBTM, el proceso comienza con la cocción del mosto de uva en recipientes abiertos para reducir el volumen inicial hasta aproximadamente el 30%. Durante esta fase, las condiciones son propicias para el desarrollo de la caramelización y de las Reacciones de Maillard [22] que generan una serie de compuestos, algunos de ellos con un impacto aromático remarcable.

Una vez cocido, el mosto se transfiere a un barril donde se lleva a cabo una fermentación alcohólica parcial (hasta 70 g/l). Después de 5 ó 6 meses, el proceso de acetificación se promueve y el producto se divide en barriles más pequeños (típicamente 5) fabricados de diferentes tipos de madera (roble, castaño, mora, enebro) y de volumen decreciente. La porosidad de cada tipo de madera y la entrada de oxígeno que permite, influye tanto en el desarrollo de la acetificación como en el aroma y color del vinagre obtenido. A esto le sigue un largo periodo de envejecimiento

durante el cual, debido a la evaporación, los barriles se rellenan empleando el método de “solera” (figura I.3.)

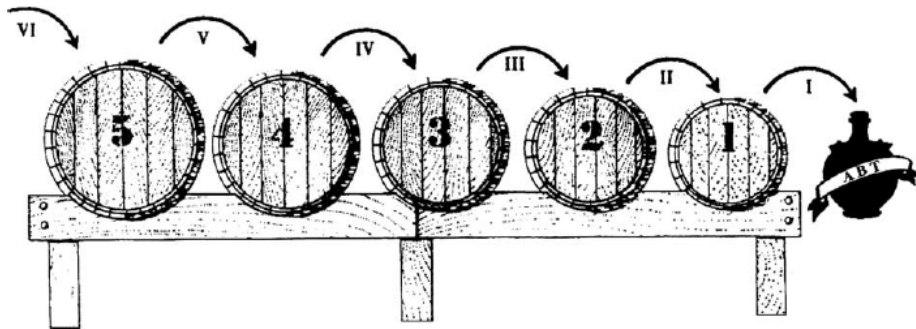


Figura I.3. Diagrama del procedimiento de la producción del vinagre balsámico tradicional. Los números arábigos identifican cada barril mientras que en los números romanos indican la secuencia de la transferencia de vinagre [23].

Sólo después de 12 años de envejecimiento, el vinagre puede ser trasvasado para ser etiquetado como VBTM “Affinato”, mientras que para el vinagre “Stravecchio”, de mayor envejecimiento, debe ser de al menos 25 años.

La diferencia más importante entre el vinagre de vino y VBTM está ligada a los microorganismos involucrados en el proceso biológico. En el VBTM, la fermentación alcohólica del mosto calentado y concentrado es incompleta, superándose con dificultad los siete grados alcohólicos; por tanto, los azúcares están siempre presentes en gran cantidad en la masa fermentativa base para la producción de éste. De este modo, en la producción del vinagre balsámico tiene lugar de forma simultánea la fermentación del azúcar y del etanol [24]. Por el contrario, en el vinagre de

vino será un proceso fermentativo en dos etapas bien diferenciadas: fermentación alcohólica (*Saccharomyces*) y oxidación acética (*Acetobacter*).

Comercialmente existe también otro producto diferente, conocido con el nombre de Vinagre Balsámico de Módena (VBM). El VBM se diferencia del mencionado VBTM, en el hecho de que procede sustancialmente de un vinagre de vino al que se le ha añadido una menor proporción de mosto cocido y se le ha añadido caramelo, además de presentar un menor periodo de envejecimiento (desde 6 meses hasta 2 años), normalmente en una única bodega de roble. Este proceso es el más difundido, con una producción de unos 160 millones de botellas de 25 cl, y con una amplia gama de precios, dependiendo de la calidad, del envejecimiento y de la presentación.

1.6. Compuestos volátiles del vinagre.

1.6.1. Perfil de algunos de los volátiles mayoritarios en el vinagre.

La composición volátil del vinagre de vino puede tener tres orígenes: el vino, materia prima de la que procede, los formados durante la acetificación y aquéllos que aparecen durante la maduración o envejecimiento en madera [25]. Cuando se intenta describir sensorialmente este producto, se hace referencia a estos tres factores que vienen representados en: la vinosidad, es decir, aquella fracción del vino que permanece en el vinagre, los aromas de la fermentación acética, representados por la sensación punzante del ácido acético y el olor a madera entre otros.

El aroma del vinagre es una fracción compleja que contiene muchos componentes con un amplio margen de volatilidad, polaridad y

concentración [26]. Entre ellos podemos encontrar tanto compuestos carbonílicos, como éteres, acetales, lactonas, ácidos, fenoles volátiles y ésteres, que participan en mayor o menor medida en esta fracción compleja.

El acetaldehído es un compuesto presente en el vino, sobretodo en aquellos con crianza biológica. Además, este compuesto se forma durante la fermentación acética bien sea por la oxidación química del etanol o como metabolito intermedio en la conversión oxidativa del etanol a ácido acético. Otro posible origen de este compuesto es la oxidación del ácido láctico a ácido pirúvico que es transformado posteriormente a acetaldehído, que puede rendir finalmente acético por la misma vía metabólica de transformación de etanol a acético [27]. Se ha constatado que durante los procesos de acetificación tiene lugar una disminución del contenido en ácido láctico del sustrato de partida, sin embargo, al ser el acetaldehído un compuesto tan volátil, desaparece en el desarrollo del proceso de acetificación que cursa con fuerte aireación [28].

La acetoína es un compuesto característico que se acumula durante el proceso de acetificación, por ello está íntimamente relacionada con la calidad [29]. Se puede encontrar en los vinagres en un amplio rango que puede ir desde 100 mg/l hasta alrededor de 1000 mg/l en vinagres envejecidos [30]. Se puede formar por varias vías, ya que una parte del acetaldehído que se origina en la oxidación del etanol a acético experimenta lo que se denomina la llamada condensación acetoínica [31] y además, se puede formar a partir de la oxidación del 2,3-butanodiol, un poliol encontrado frecuentemente en vinagres de Jerez que hayan sido sometidos a envejecimiento biológico [32].

Los alcoholes superiores tienen una importante presencia en los vinos antes de la acetificación, unos permanecen en cantidad inalterada o

casi inalterada durante el ciclo de transformación del vino en vinagre [33, 34]. Otros, en cambio, decrecen de forma acusada durante la acetificación [35].

Los alcoholes isoamílicos representan una fracción abundante dentro de los compuestos volátiles del vinagre de vino, de hecho constituyen el 6-7% del total de éstos, siendo su concentración superior en productos considerados de alta calidad [36]. Los alcoholes isoamílicos pueden transformarse en el correspondiente ácido isovalérico. El cociente entre el 3-metil-1-butanol y el 2-metil-1-butanol es un indicador adecuado para juzgar el proceso de acetificación ya que disminuye conforme avanza el mismo [35]. El 2-metil-1-butanol es metabolizado por las bacterias acéticas a un ritmo menor que el 3-metil-1-butanol, por ello, cuando la velocidad de acetificación es elevada se produce un brusco descenso de dicho cociente [28].

El contenido equilibrado de ésteres juega un papel importante sobre las características organolépticas del vinagre de vino, ya que intervienen en el olor y sabor, y en especial en los envejecidos, dándole la finura y el valor típico de los productos de calidad.

En el caso de los vinagres, pequeñas cantidades de ésteres proceden del vino y en gran medida se forman por la reacción interna durante la maduración y el envejecimiento. Alcanzan la cantidad óptima después de algunos meses y permanecen casi inalterados incluso durante años, si no se da un proceso fermentativo anormal que produzca la hidrólisis de éstos [33].

Los ésteres se clasifican en volátiles y no volátiles. Los primeros intervienen en el aroma y son principalmente el acetato de metilo, etilo, amilo e isoamilo, mientras que los no volátiles influyen en el gusto y los más

destacables son el succinato, malato y tartrato de etilo. El éster volátil cuantitativamente más importante es el acetato de etilo. Se forma a partir de acético y etanol, previa eliminación de una molécula de agua, reacción catalizada por una esterasa [37].

En el vinagre común, que contiene una pequeña cantidad de etanol residual, la concentración de acetato de etilo es similar a la que existía en el vino del cual se originó, mientras que en los vinagres de calidad, que se caracterizan por una concentración residual de etanol del orden del 0,6-1%, la cantidad de acetato de etilo puede ser más elevada alcanzando valores superiores a 1000 mg/l [26]. De ahí la mayor fragancia y olor de estos vinagres frente a los de fabricación y composición normal [33]. El acetato de etilo es un compuesto altamente volátil y de baja solubilidad [38]. En los sistemas de acetificación abiertos, este compuesto es arrastrado por la corriente de aire y se observan importantes pérdidas [28]. No obstante si la maduración se lleva a cabo en presencia de cantidades de etanol residual del orden de 2°, se consigue que en sólo tres meses de envejecimiento, se duplique e incluso triplique la cantidad de acetato de etilo con la que se inicia el envejecimiento del vinagre llegándose en algunos casos a concentraciones del orden de 8 g/l para este compuesto [30].

1.6.2. Antecedentes bibliográficos de la cromatografía gaseosa aplicada a los compuestos volátiles del vinagre.

Hasta el advenimiento de la técnica de cromatografía gaseosa no se pudo llevar a cabo la separación y cuantificación conjunta de la fracción volátil del vinagre.

La aplicación de los métodos cromatográficos comenzó en Italia en 1962, cuando Morgantini detectó etanol en vinagre de malta [39].

Suomalainen y Kangasperko [40], afinan más en la caracterización de los compuestos volátiles del vinagre vínico. Establecen que la fracción de ésteres contiene acetatos de etilo, isobutilo e isoamilo, identificando, también, diacetilo y los siguientes alcoholes: isobutírico, n-amílico e isoamílico. Comprueban, además, que una muestra de vinagre destilado contiene como único compuesto volátil acetato de etilo. Otros autores emplearon la técnica de espacio de cabeza llegando a identificar hasta 25 componentes volátiles distintos, analizando muestras procedentes de materias primas muy diversas (vino, sidra, malta y alcohol) [41]. Hasta 1972 no se empleó por primera vez en vinagres, para la identificación de los compuestos, la espectrometría de masas [42].

En 1978 se diseñaron dos columnas de fase mixta para la separación y cuantificación de los componentes volátiles mayoritarios característicos de los productos de fermentación alcohólica, de ciertos destilados, y de vinagres [43]. El método supuso indiscutibles ventajas frente a todos los descritos hasta la época; sin embargo, el análisis resultaba largo, porque se requerían dos columnas de 4,8 y 6,7 m que, aunque podían trabajar en paralelo, suponían un tiempo de análisis de 75 y 90 minutos cada uno.

El siguiente avance en el estudio de los compuestos volátiles fue la aparición de las columnas capilares. Aunque tienen menor capacidad de carga, estas columnas poseen eficacias totales altas, siendo la mejor alternativa cuando se han de separar mezclas muy complejas. La fase que rellena estas columnas queda inmovilizada y entrecruzada mediante enlaces covalentes entre las moléculas de la fase estacionaria entre sí y con la superficie del tubo [44].

Los cambios efectuados en la instrumentación hacia métodos más sofisticados de análisis de compuestos volátiles en vinagres han obligado

paralelamente a optimizar los tratamientos de muestra para que dichos métodos de análisis supongan un avance real en el conocimiento del aroma del vinagre. Los tratamientos de las muestras han ido desde el empleo de la extracción líquido-líquido con diferentes disolventes pasando por la extracción en fase sólida o el empleo de técnicas de espacio de cabeza dinámico, etc. [25]

La extracción líquido-líquido se ha empleado como etapa previa en el análisis de aromas de alimentos [45-47]. Sin embargo, algunos compuestos volátiles pueden perderse en los pasos de concentración que hay que realizar. También suele ocurrir que aparecen interferencias entre los picos de compuestos volátiles de interés en la muestra y los de los disolventes y sus impurezas, perdiéndose en ocasiones una valiosa información.

La destilación con extracción simultánea (SDE) ha demostrado su utilidad, proporcionando un adecuado enriquecimiento en varios tipos de muestras sin el requerimiento del paso previo de concentración [48-50].

Otras técnicas de extracción, como la purga y la trampa, han permitido extraer muchos compuestos volátiles y sublimables de las muestras, pudiéndose caracterizar objetivamente las sustancias responsables del aroma y diferenciar, basándose en ellas, varios tipos de vinagres: vinagre tradicional balsámico procedente de Módena y Reggio-Emilia, vinagre común y vinagre balsámico [51].

Dado que para analizar la fracción aromática de los vinagres, la fase más crítica es la extracción y concentración de las sustancias volátiles, algunos autores se han decantado por el empleo de la inyección directa de las muestras, siendo suficiente para la detección de fraudes [35] y la

caracterización de vinagres de vino según los métodos de elaboración, sustratos vínicos empleados y tiempo de envejecimiento en madera [28, 30].

Uno de los retos que se plantean en la actualidad con referencia al conocimiento de la fracción volátil de los alimentos es definir la contribución que cada compuesto hace al aroma. Para hacer frente a tal cuestión aparecen dos nuevas herramientas analíticas, la cromatografía de gases olfatómetrica (GC-O) y la olfatometría (nariz electrónica).

En la primera de estas dos técnicas, un panel de jueces entrenados va adjudicando una descripción verbal a cada olor detectado. Aceña y col. [52] y Callejón y col. [53, 54], han aplicado esta técnica al análisis de compuestos volátiles en vinagre, obteniendo excelentes resultados. Por otra parte, la nariz electrónica es un instrumento que permite, en pocos minutos, comparar y clasificar los aromas de los productos alimentarios, por lo que resulta un excelente complemento para el análisis sensorial. Empleando la nariz electrónica, se ha caracterizado el aroma de vinagres balsámicos y tradicionales [55], vinagres chinos [56, 57], y se ha conseguido la diferenciación de vinagres procedentes de diferentes materias primas y procesos de producción [58].

Las tendencias actuales en el campo del análisis de compuestos volátiles indican que la combinación de la extracción en fase sólida con la técnica de desorción térmica programada que introduce los compuestos volátiles directamente en la columna permite obtener muy buenos resultados. Este último tipo de métodos ha abierto un amplio abanico de posibilidades en el estudio de los aromas del vinagre de vino, y se tratarán de manera detallada en el capítulo siguiente.

1.7. Bibliografía.

- [1] Presidencia del Gobierno (1993). Real Decreto 2070/1993 de 26 de Noviembre, Boletín Oficial del Estado num. 293 de 8 de Diciembre, por la que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y comercialización de los vinagres.
- [2] Presidencia del Gobierno (1973). Decreto 3024/73 de 23 de Noviembre, Boletín Oficial del Estado de 4 de Diciembre, sobre reglamentación para la elaboración, circulación y comercio del vinagre de vino y de orujo.
- [3] M. Guzmán Chozas, “El vinagre, características, atributos y control”. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid, 1998.
- [4] C. Llaguno, “Antecedentes históricos”, en: El vinagre de vino, ed. por C. Llaguno y M.C. Polo, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1991, pág. 1.
- [5] A.B. Cerezo, W. Tesfaye, M.J. Torija, E. Mateo, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, Food Chem. 109 (2008) 606.
- [6] A. Mas, “Wood Solutions to excessive acetification length in traditional vinegar production”, en: Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres, ed. por I. García-García, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, 2006, pág. 111.
- [7] H.A. Conner y R.J. Allgeier, Adv. Appl Microbiol. 20 (1976) 81.
- [8] O. Hromatka, W. Exner, Enzymologia 25 (1963) 37.
- [9] A.R. Ormaechea, “Proceso industrial de fabricación del vinagre”, en: El vinagre de vino, ed. por C. Llaguno y M.C. Polo, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1991, pág. 49.
- [10] I. García-García, I.M. Santos-Dueñas, C. Jiménez-Ot, J.E. Jiménez-Hornero, J.L. Bonilla-Venceslada, “Vinegar Engineering”, en: Vinegars of the World, ed. por L. Solieri y P. Giudici, Springer-Verlag, Milán, Italia, 2009, pág. 98.

- [11] I. de Ory, L.E. Romero, D. Cantero, *Bioprocess Eng.* 21 (1999) 187.
- [12] I. García-García, D. Cantero-Moreno, C. Jiménez-Ot, S. Baena-Ruano, J. Jiménez-Hornero, I. Santos-Dueñas, J. Bonilla-Venceslada, F. Barja, *J. Food Eng.* 80 (2007) 460.
- [13] O. Maestre, I.M. Santos-Dueñas, R. Peinado, C. Jiménez-Ot, I. García-García, J.C. Mauricio, *Process Biochem.* 43 (2008) 803.
- [14] D. Garrido-Vidal, C. Pizarro, J.M. González-Sáiz, *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 1468.
- [15] D. Garrido-Vidal, I. Esteban-Díez, N. Pérez del Notario, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Near Infrared Spec.* 12 (2004) 15.
- [16] S. Sellmer, “New strategies in process control for the production of wine vinegar”, en: *Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres*, ed. por I. García-García, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, 2006, pág. 127.
- [17] F. Emde, “State-of-the-art Technologies in submersible vinegar production”, en: *Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres*, ed. por I. García-García, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, 2006, pág. 101.
- [18] F. Yanagida, “Recent brewing Technologies” en, *Sunokagaku*, ed. por M. Ameyama y S. Otsuka, Asakura Shoten, Tokio, Japón, 1990, pág. 97.
- [19] F J. Merino, R.M. Fernández, “Vinagres andaluces con Denominación de Origen”, en: *Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres*, ed. por I. García-García, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, 2006, pág. 265.
- [20] Consejería de Agricultura y Pesca (2008). *Reglamento de la Denominación de Origen Protegida Vinagre de Jerez*. BOJA núm. 184. Sevilla, 16 de Septiembre de 2008, pág. 29.

- [21] W. Tesfaye, M.L. Morales, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, “Jerez Vinegar”, en: *Vinegars of the World*, ed. por L. Solieri y P. Giudici, Springer-Verlag, Milán, Italia, 2009, pág. 179.
- [22] A. Piva, C. Di Mattia, L. Neri, G. Dimitri, M. Chiarini, G. Sacchetti, *Food Chem.* 106 (2007) 1057.
- [23] F. Masino, F. Chinnici, G.C. Franchini, A. Ulrici, A. Antonelli, *Food Chem.* 92 (2005) 673.
- [24] E. Chiavaro, A. Caligiani, G. Palla, *Ital. J. Food Sci.* 10 (1998) 329.
- [25] M.L. Morales, A.M. Troncoso, *Alimentación Equipos y Tecnología*, Marzo (2002) 73.
- [26] G.P. Blanch, J. Tabera, J. Sanz, M. Herrainz, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.* 48 (1992) 70.
- [27] R. Parés y A. Juárez, “*Bioquímica de los microorganismos*”. Editorial Reverté S.A., Barcelona, 1997.
- [28] M.L. Morales, W. Tesfaye, M.C. García-Parrilla, J.A. Casas, A.M. Troncoso, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 611.
- [29] C. Llaguno y C. Polo, “La composición química en los vinagres véricos”, en: *El vinagre de vino*, ed. por C. Llaguno y M.C. Polo, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1991, pág. 105.
- [30] M.L. Morales, W. Tesfaye, J.A. Casas, A.M. Troncoso, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3173.
- [31] R. Parés, A. Juárez, “*Bioquímica de los microorganismos*”, Reverté, Barcelona. 1997.
- [32] J.A. Moreno, L. Zea, L. Moyano, M. Medina, *Food Cont.* 16 (2005) 333.
- [33] F. Mecca, R. Andreotti, L. Veronelli, “*L’Aceto*”. Aeb, Brescia, 1979.
- [34] J.F. Guymon, *Dev. Ind. Microbiol.* 7 (1966) 96.
- [35] J.Nieto, M.A. González-Viñas, P. Barba, P.J. Martín-Álvarez, L. Aldave, E. García-Romero, M.D. Cabezudo, “Recent progress in wine

- vinegar R & D and some indicators for the future”, en: Food flavour, ingredients and composition. Elsevier Science Publisher B.V., New York, 1993, pág. 469.
- [36] A.M. Troncoso, M. Guzmán, Z. Lebensm Unters Forsch. 185 (1987) 130.
- [37] E. Navascués, F. Calderón, J. Vila, M.J. Callejo, B. Colomo, J.A. Suárez, “Influencia de la temperatura sobre la formación de volátiles secundarios”, en: XVII Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. Almendralejo, 1995, pág. 619.
- [38] J.M. Gómez, L.E. Romero, I. Caro, D. Cantero, Biotechnol. Tech. 8 (1994) 711.
- [39] M. Morgantini, Boll. Lab. Chim. Prov. 13 (1962) 117.
- [40] H. Suomalainen, J. Kangasperko, Z. Lebensm Unters Forsch. 120 (1963) 353.
- [41] L.W. Aurand, J.A. Singleton, T.A. Bell, J.L. Etchells, J. Food Sci. 31 (1966) 172.
- [42] J.H. Kahn, G.B. Nickol, H.A. Conner, J. Agric. Food Chem. 20 (1972) 214.
- [43] M.D. Cabezudo, E.F. Gorostiza, M. Herraiz, J. Chromatogr. Sci. 16 (1978) 61.
- [44] M. González, G.Reglero, M. Herraiz, M.D. Cabezudo, Alimentación (1985) 65.
- [45] P.J. Hardy, J. Agric. Food Chem. 17 (1969) 656.
- [46] A. Rapp, H. Hastrich, L. Engle, Vitis 15 (1976) 29.
- [47] G.L. Fagan, R.E. Kepner, A.D. Webb, Am. J. Enol. Vitic. 33 (1982) 47.
- [48] A.J. Núñez, J.M.H. Bemelmans, J. Chromatogr. 294 (1984) 361.
- [49] A.J. Núñez, J.M.H. Bemelmans, H. Maarse, Chromatographia 18 (1984) 153.

- [50] G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, J. Tabera, J. Chromatogr. Sci. 29 (1991) 11.
- [51] A. Del Signore, J. Food Eng. 50 (2001) 77.
- [52] L. Aceña, M.P. Martí, M. Mestres, J. Guasch, “Estudio olfatométrico del aroma del vinagre” en: Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. *Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector Vitivinícola*, ed. por M.Ramírez y col., Badajoz, 2007, pág. 375.
- [53] R.M. Callejón, M.L. Morales, A.M. Troncoso, A.C. Silva, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 6631.
- [54] R.M. Callejón, M.L. Morales, A.C. Silva, A.M. Troncoso, J. Agric. Food Chem, 56 (2008) 8086.
- [55] E. Anklam, M. Lipp, B. Radovic, E. Chiavaro, G. Palla, Food Chem. 61 (1998) 243.
- [56] Q. Zhang, S. Zhang, C. Xie, D. Zeng, C. Fan, D. Li, Z. Bai, Sensor. Actuat. B-Chem. 119 (2006) 538.
- [57] Q. Zhang, S. Zhang, C. Xie, C. Fan, Z. Bai, Sensor. Actuat. B-Chem. 128 (2008) 586.
- [58] M.J. Hernández, “Estudios de parámetros diferenciadores de vinagres procedentes de diferentes materias primas y procesos de producción”. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 2003.

II TÉCNICAS ANALÍTICAS DE EXTRACCIÓN EMPLEADAS EN EL ANÁLISIS DEL AROMA DEL VINAGRE Y OTROS PRODUCTOS ENOLÓGICOS.

II.1. Introducción.

El estudio de la fracción volátil en el vinagre, y en los productos enológicos en general, ha llegado a ser necesaria y suficientemente justificada, al considerar que estos compuestos proporcionan una mayor contribución a la percepción general de la calidad de los diferentes productos alimentarios. De hecho, estos compuestos volátiles complejos determinan en gran manera la aceptación o rechazo de muchos productos por parte del consumidor. Además, existen olores característicos de estos productos, conocidos como “off-flavours”, causados por la presencia de volátiles, que, además de proporcionar olores y aromas desagradables, a menudo implican contaminación microbiana; así, el estudio de los volátiles forma parte de los estudios de seguridad alimentaria.

La fracción volátil de estos alimentos y bebidas está condicionada por las circunstancias que inciden en su producción, y, en consecuencia, la caracterización y diferenciación de estos productos se puede realizar en base a su fracción volátil. En muchos estudios se constata la posibilidad de establecer relaciones entre los siguientes aspectos: la materia prima empleada, el lugar de producción, el proceso de producción empleado, etc. y la fracción volátil del producto [1-6].

La determinación de la fracción volátil normalmente se realiza mediante cromatografía gaseosa (GC), una técnica que en los últimos años ha experimentado grandes avances. Sin embargo, se debe reconocer que a pesar de esto, en la mayoría de los casos, la determinación por GC necesita

ser precedida por una fase previa de preparación de muestra. La necesidad de la preparación de la muestra viene impuesta por varios factores, los más notables son los siguientes:

- Las bajas concentraciones en los que el analito de interés está presente.
- La gran variedad química que éstos presentan: ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas y muchos otros tipos de compuestos que pueden ser encontrados.
- El hecho de que la mayoría de los casos estos compuestos son encontrados en matrices de gran complejidad, como es el caso de los productos enológicos.
- Y por último, la baja estabilidad química de estos compuestos, junto con la especificidad limitada de los sistemas de detección.

Todas estas consideraciones nos llevan a buscar técnicas que permitan su fraccionamiento y concentración antes del análisis por GC, transformando la preparación de muestra en un paso crítico a la hora de caracterizar la fracción volátil de estos productos.

Si, en primer lugar, consideramos cómo clasificar las diferentes técnicas usadas para la preparación de muestra previa al análisis por GC, encontramos un gran número de diferentes clasificaciones en uso. Uno de los criterios aceptados cuando se trata con esta clasificación es la propiedad físico-química en cual se basa el aislamiento de estos analitos [7]. Por tanto encontramos que existen técnicas basadas en:

- La volatilidad de los analitos: procesos de destilación y técnicas de espacio de cabeza.

- La solubilidad del analito en diversos disolventes orgánicos: extracción soxhlet, extracción líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE), extracción mediante fluidos supercríticos (supercritic fluids extraction, SFE), extracción en fase sólida (solid-phase extraction, SPE), extracción asistida por ultrasonidos (ultrassound assisted extraction, UAE), y extracción asistida por microondas (microwave assisted extraction, MAE).
- La absorción y adsorción del analito sobre un material determinado: extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (solid-phase microextraction, SPME), extracción por absorción en barra agitadora (stir bar sorptive extraction, SBSE) y extracción en fase sólida dinámica (solid-phase dynamic extraction, SPDE).
- Y el último grupo donde encontramos aquellas técnicas que hacen uso de ambas propiedades: la más importante de estas es la extracción destilación simultánea, junto con otras configuraciones instrumentales donde se combinan otras de las técnicas anteriormente mencionadas.

A continuación, nos centraremos en varias de las técnicas del tercer grupo, siendo algunas de las actualmente más utilizadas para el análisis del aroma del vinagre, en particular, y de los productos enológicos en general.

II.2. Extracción en fase sólida (SPE).

La SPE se puede aplicar directamente para aislar y concentrar compuestos volátiles de muestras líquidas. Esta técnica, introducida en los 80, está basada en la retención selectiva de algunos analitos y su posterior elución empleando un disolvente adecuado.

Dependiendo del tipo de absorbente y de las características del analito, se establece una serie de interacciones físicas y químicas que permiten al analito de interés ser separado del resto de los componentes de la muestra. La selectividad de esa separación vendrá condicionada por el tipo de absorbente y el eluyente empleado.

La figura II.1 muestra el procedimiento típico utilizado para llevar a cabo la extracción en fase sólida.

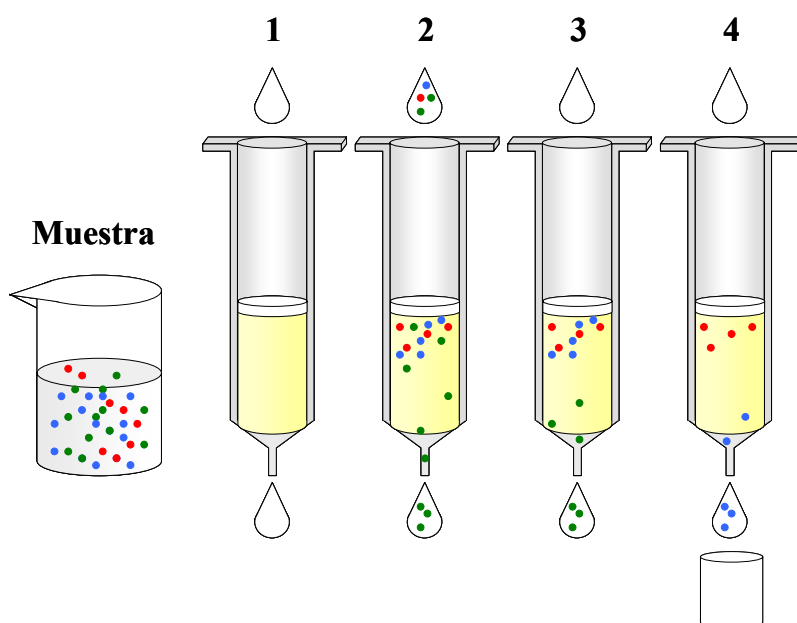


Figura II.1. Procedimiento típico de SPE.

1. Acondicionamiento; 2. Introducción de la muestra; 3. Lavado; 4. Elución.

• Analito; • Interferencias.

Los absorbentes utilizados son similares a las fases estacionarias empleadas en cromatografía líquida, y pueden ser agrupados en polares, no polares, y de intercambio iónico. La elección del absorbente depende de la naturaleza del analito, de la matriz, y de posibles interferencias. Son de particular importancia los absorbentes de sílice, y los poliméricos como los copolímeros estireno-divinilbenzeno. Los absorbentes de sílice se

caracterizan por presentar una baja capacidad de carga y un alto consumo de disolventes y tiempo; además en algunos casos, podemos encontrarnos absorciones irreversibles y con la degradación de ciertos analitos [8]. El segundo tipo, basado en polímeros estireno-divinilbenceno, se caracterizan por presentar una mayor capacidad de carga, mayor estabilidad frente a valores extremos de pH, sumado a la capacidad para su empleo tanto en modo normal como en modo reverso [8].

La SPE es una técnica que tiene grandes aplicaciones en enología, desplazando en algunos casos a la extracción líquido-líquido.

II.2.1. Aplicaciones de la SPE al estudio del aroma del vinagre.

El vinagre se emplea no sólo como condimento, sino también como ingrediente en muchos productos alimentarios, particularmente salsas y aliños. Debido a la diversidad de los vinagres que se encuentran en el mercado y a su, cada vez mayor demanda, se hace conveniente el investigar sobre métodos analíticos fiables para establecer criterios para la determinación del origen y la calidad del producto. Charles y col. [9], después de la neutralización con NaOH, estudiaron la representatividad de cuatro extractos obtenidos con extracción líquido-líquido mediante diclorometano y SPE empleando XAD-2, una mezcla de XAD-2 y XAD-7 y resinas Extrelut. El extracto líquido-líquido fue el más representativo de la fracción volátil del vinagre.

Más tarde, Morales y col. compararon dos métodos SPE con un método de extracción líquido-líquido con diclorometano para el análisis de compuestos volátiles en vinagres [10]. Para la extracción en fase sólida, se probaron dos tipos de cartuchos: un LiChrolut-EN y un Bond Elut-ENV. En ambos casos se empleó diclorometano como eluyente. La extracción líquido-

líquido mostró más capacidad de extracción que los métodos SPE solamente para el furfuril alcohol. En relación a los métodos SPE, los cartuchos Bond Elut-EMV proporcionaron respuestas más bajas para los compuestos furánicos, de modo que los autores seleccionaron los cartuchos LiChrolut-EN para la extracción de compuestos volátiles de vinagre.

Finalmente, en 2008 se desarrolló un método para la extracción de compuestos volátiles en muestras de vinagres balsámicos tradicionales de Módena [11], que se verá con mayor detalle en el capítulo VI de la presente Tesis. Mediante aproximaciones estadísticas, se llegó a que las condiciones óptimas para la extracción de este tipo de compuestos en muestras tan complejas eran: cartuchos LiChrolut-EN, empleando 7 g de muestra diluída 1:4, 5 ml de agua de lavado, y 10 ml de diclorometano como eluyente. El método optimizado fue posteriormente validado analíticamente y aplicado a muestras reales de vinagres balsámicos tradicionales.

II.2.2. Aplicaciones de la SPE al estudio del aroma del vino.

Wada y Shibamoto [12] estudiaron la extracción de olores en vinos tintos empleando columnas Porapak Q (copolímero etilvinilbenzeno-divinilbenzeno). Emplearon diferentes disolventes, el diclorometano resultó ser el mejor, con recuperaciones próximas al 100%.

Diferentes autores han empleado los copolímeros estireno-divinilbenzeno para estudiar la fracción volátil de diferentes productos enológicos [8, 13-15]. López y col. [13] emplearon LiChrolut-EN (copolímero estireno-divinilbenzeno) para la extracción de 27 volátiles en vino. Se extrajeron 50 ml de vino empleando 200 mg de resina. Los autores concluyeron que la metodología analítica de SPE era apropiada para el estudio del aroma del vino.

Más tarde, Culleré y col. [8], empleando el mismo tipo de absorbente, llevaron a cabo el fraccionamiento del aroma del vino. En primer lugar, los compuestos volátiles fueron aislados y concentrados con diclorometano y, luego, se fraccionaron empleando un segundo cartucho LiChrolut-EN. Se eluyó una primera fracción rica en ésteres etílicos y, del segundo cartucho, fue eluído con pentano algún otro compuesto no polar. La segunda fracción, que concentra los alcoholes y algunos fenoles volátiles, fue eluída con pentano-diclorometano (9:1), mientras que en la tercera fracción, eluída con diclorometano, era rica en ácidos grasos, derivados de la vainillina y lactonas.

Genovese y col. [15] emplearon tres métodos de extracción para la determinación de la composición del aroma en vinos tintos: la separación de la fracción alcohólica de la fase acuosa mediante “salting out” y extracción líquido-líquido con triclorotrifluoroetano; extracción líquido-líquido con diclorometano; y extracción en fase sólida empleando 800 mg de resina LiChrolut-EN con pentano-diclorometano (20:1) y diclorometano. Estos autores concluyeron que, debido a la variedad de las especies químicas que constituyen el aroma de los vinos tintos, sólo la combinación de diferentes técnicas de extracción puede permitir su evaluación completa

En la bibliografía se pueden encontrar diversos estudios acerca de los absorbentes de sílice y los compuestos volátiles de los productos enológicos [16-18]. Lukic y col. investigaron las propiedades de adsorción del absorbente octadecilsílice para la determinación de algunos compuestos del aroma de la fermentación y del aroma varietal en destilados de uva [16]. En este caso, un volumen de muestra de 3 ml fue diluido en 25 ml, utilizando como disolvente el diclorometano. El método SPE fue validado y se evaluó el posible efecto matriz del contenido en ácido acético y etanol. En general

se obtuvieron buenas recuperaciones, excepto para algunos alcoholes como el 2-feniletanol, cis-2-hexen-1-ol y cis-3-hexen-1-ol. Estos autores concluyeron que la influencia de la cadena alquílica no polar en la cadena principal de la molécula de alcohol o ácido prevalece sobre el carácter hidrofílico del grupo funcional hidroxilo o carboxílico y es la responsable de las altas recuperaciones de la SPE. Esto está en concordancia con Ferreira y col. [17], que encontraron que los absorbentes basados en sílice eran apropiados para la extracción de analitos que mostraran un carácter ácido de Bronsted-Lowry.

Entre los compuestos volátiles que son responsables del carácter floral de los vinos, se pueden encontrar algunos monoterpenos. Sus concentraciones en las uvas y vinos están influenciadas por diferentes factores, como la variedad de uva, el clima, las prácticas viticultoras y enológicas, etc. Obtener un “perfil terpénico” es extremadamente útil para diferenciar a los vinos genuinamente monovarietales de aquellos producidos con una mezcla de varias variedades. Además, la determinación del perfil anteriormente mencionado, es una herramienta muy válida para la detección del fraude.

Karagiannis y col. [19] llevaron a cabo un primer estudio empleando un cartucho C18 para determinar el contenido de terpenos (libre y glucosilado) en vinos del blanco Muscat Lefko de la isla griega de Samos. La extracción de terpenos libres, mono y dihidroxilados se realizó usando diclorometano, mientras que la extracción de terpenos trihidroxilados y glucosilados se llevó a cabo con metanol. Más tarde, Piñeiro y col. [20] compararon diferentes cartuchos de C18 con otros con fase sólida de estireno-divinilbenceno para la determinación de derivados monoterpénicos en vinos. Los mejores resultados se obtuvieron para dos cartuchos estireno-

divinilbenceno, LiChrolut-EN y Strata SDB-L, empleando diclorometano como eluyente.

Las lactonas son un grupo de compuestos que contribuyen de manera importante al aroma de los vinos [21]. Ferreira y col. han desarrollado un método de SPE para la extracción selectiva de lactonas alifáticas en vinos [22]. Para ello se acondicionaron 200 mg de resinas Bond Elut-ENV mediante la adición de 2 ml de metanol y 4 ml de agua. Después se hicieron pasar 50 ml de vino a través del cartucho. Las interferencias se eliminaron mediante una mezcla de metanol-agua 40:60 (v/v) enriquecido con 1% (w/v) NaHCO_3 . Las lactonas fueron eluidas con 1.8 ml de diclorometano. Más tarde, el volumen se concentraba hasta 0.15 ml en un baño a 47°C. Siguiendo esta metodología, ha sido posible la cuantificación de ocho lactonas alifáticas (C8-C12) en vinos, con recuperaciones mayores del 75% y una excelente precisión (RSD media 3.5%) y linealidad ($r^2 \geq 0.996$).

Recientemente, Campo y col. [23] emplearon una metodología basada en la extracción en fase sólida para la determinación de cuatro importantes compuestos aromáticos ((2-, 3-, y 4-metilpentanoato y etil ciclohexanoato) en vino, whisky, brandy. Se extrajeron 100 ml de muestra empleando un cartucho LiChrolut-EN. Se utilizó una disolución agua-metanol con los compuestos mayoritarios y se usó diclorometano como eluyente.

II.2.3. Aplicaciones de la SPE al estudio de los aromas indeseables en vinos.

La contaminación del corcho es una de los defectos organolépticos más significativos en vinos. El corcho es el material tradicional empleado en

la producción de tapones de botellas de vino. Dichos tapones se obtienen de la corteza del alcornoque (*Quercus suber*), que crece principalmente en los países mediterráneos. El corcho es un producto natural y no es inerte, de modo que puede interactuar con el vino, algunas veces modificando su aroma e incluso causando defectos organolépticos. Este es el del olor a moho o a humedad, tradicionalmente conocido como contaminación del corcho (cork taint). Algunos de los compuestos implicados en este defecto pueden ser originados en el tapón de corcho. El principal responsable es el 2,4,6-tricloroanisol (TCA), pero también, aunque en menor grado, son responsables el 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA) y el 2,3,4,5,6-pentacloroanisol (PCA). Los cloroansoles usualmente proceden de la o-metilación de los clorofenoles, como un método de detoxificación empleado por diferentes microorganismos, especialmente hongos, bajo condiciones particulares de temperatura y humedad. Los clorofenoles a menudo están presentes en el vino debido al empaquetado, los fungicidas, herbicidas o conservadores de la madera que se usan en la bodega, o las prácticas de algunos fabricantes de tapones de corcho, como usar hipoclorito como decolorante del corcho. Los vinos también pueden ser contaminados en la bodega. Por ejemplo, la contaminación por clorofenol puede producirse en los palés de cajas empleados para el almacenamiento de botellas. Estos clorofenoles pueden transformarse en cloroansoles, que contaminan la atmósfera de la bodega y, consecuentemente, contaminan el vino durante las operaciones de bodega. La presencia de cloroansoles en vino se debe a su habilidad a migrar desde el corcho. Teniendo en cuenta el mal olor (off-flavours) y el bajo umbral de percepción sensorial de estos compuestos, entre 1 ng/l y 50 ng/l, esta migración puede implicar serias consecuencias organolépticas de los vinos afectados, disminuyendo su calidad.

Por tanto, la determinación de cloroansoles en vinos, ha promovido una extensa investigación en la última década para desarrollar métodos tan

sensibles como el umbral de detección humano. Para evitar las pérdidas económicas causadas por este olor a moho, es muy importante prevenir este defecto mediante un control efectivo de cloroanisoles en corcho. Este control requiere de métodos analíticos apropiados que puedan proporcionar la suficiente sensibilidad y selectividad, así como una buena repetibilidad y recuperación. La cromatografía gaseosa es la técnica más común empleada en estos estudios, normalmente acoplada a un detector de espectrometría de masas, o a un detector de captura electrónica (electron capture detector, ECD) y, recientemente, acoplado a un detector de emisión atómica. Sin embargo, debido al bajo contenido de cloroanisoles en corcho, es necesario un paso previo de extracción y concentración, para lo que se han empleado diferentes técnicas. Insa y col. desarrollaron un método de SPE para la determinación de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) y 2,4,6-tribromoanisol (TBA), compuestos que parecían ser los que más influyen en este problema [24]. En este método, se extraían 50 ml de vino con 50 mg de resinas LiChrolut-EN, empleando 0.6 ml de diclorometano como eluyente. Una alícuota de 40 µl de este extracto se inyectaba en el sistema de cromatografía gaseosa, empleando un inyector de vaporización mediante temperatura programada (programmed temperature vaporization, PTV) como técnica de gran volumen de inyección. El método SPE fue validado, obteniéndose valores de RSD menores que el 6% y recuperaciones mayores que el 80%. Los límites de detección estaban entre 0.2 y 0.4 ng/l para el TCA y el TBA respectivamente. Estos valores están por debajo del umbral de detección de estos compuestos.

Otro compuesto volátil estudiado en productos como el vino, y que se caracteriza por un olor a hongos, es el 1-octen-3-ona. Su determinación en vinos ha sido recientemente optimizada por Culleré y col. [25]. El analito se preconcentra selectivamente en un cartucho LiChrolut-EN de 90 mg, para, posteriormente, derivatizarlo con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina (PFBHA) en el mismo cartucho. La elución de la oxima del

analito se lleva a cabo con 2 ml de pentano. Se obtuvo una buena linealidad, superior a 900 ng/litro, con coeficientes de correlación de 0.9990. La precisión obtenida fue satisfactoria y el método estaba libre de efecto matriz.

Entre los compuestos volátiles que afectan negativamente al aroma del vino están los fenoles volátiles como etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguaicol) y vinifenoles (4-vinilfenol y 4-vinilguaicol). Estos compuestos se consideran parte de la composición del aroma de los vinos y pueden producir olores desagradables, afectando negativamente a la calidad del vino. Domínguez y col. [26] desarrollaron un método de SPE para determinar fenoles volátiles en vino fino de Jerez, un vino blanco típico de la denominación de origen Jerez-Xérès-Sherry [27]. Los cartuchos empleados fueron LiChrolut-EN (200 mg), acondicionados con 5 ml de metanol y 3 ml de agua. Se usaron 10 ml de vino. Posteriormente se añadieron 0.6 ml de agua y fueron secados con helio. Finalmente, se emplearon 2.5 ml de diclorometano como eluyente. La metodología SPE optimizada por los autores fue comparada con otros dos métodos basados en extracción líquido-líquido. El método de extracción en fase sólida presentaba una mayor selectividad y sensibilidad para estos compuestos. Además, diferentes ventajas prácticas, en relación al volumen de muestra, al tiempo, y al número de muestras extraídas en una sesión de extracción simple, llevaron a los autores a seleccionar la metodología SPE para la determinación de fenoles volátiles en vino fino de Jerez.

En la tabla II.1 se recogen las diferentes aplicaciones de la extracción en fase sólida en el vinagre y otros productos enológicos.

Tabla II.1. SPE. Condiciones analíticas empleadas para el análisis de compuestos volátiles en productos enológicos.

Autores	Matriz	Columna	Analitos	Condiciones de extracción
Charles y col. [9]	Vinagre	Est-DVB	Aroma	-
Morales y col. [10]	Vinagre	Est-DVB	Aroma	<i>Disolvente:</i> diclorometano
Durán y col. [11]	Vinagre	Est-DVB	Aroma	<i>Cantidad de muestra:</i> 7 g.; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Wada y Shibamoto [12]	Vino tinto	EVB-DVB	Aroma	<i>Disolvente:</i> diclorometano
Culleré y col. [8]	Vino	Est-DVB	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 75 ml; <i>Disolventes:</i> diclorometano, pentano y pentano:diclorometano (9:1)
López y col. [13]	Vino	Est-DVB	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 50 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Genovese y col. [15]	Vino tinto	EVB-DVB	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 50 ml; <i>Disolventes:</i> pentano:diclorometano (20:1) y diclorometano
Lukic y col. [16]	Destilado de uva	Octadecilsilica	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 3 ml diluído hasta 25 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Dieguez y col. [18]	Espirituosos	Silica	Ácidos orgánicos volátiles	<i>Volumen de muestra:</i> 50 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Karagiannis y col. [19]	Vino blanco	Silica	Terpenos	<i>Volumen de muestra:</i> 25 ml; <i>Disolventes:</i> diclorometano y metanol
Piñeiro y col. [20]	Vino blanco	Est-DVB	Terpenos	<i>Disolvente:</i> diclorometano
Ferreira y col. [22]	Vino	Est-DVB	Lactonas alifáticas	<i>Volumen de muestra:</i> 50 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Campo y col. [23]	Vino, whisky y brandy	Est-DVB	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 100 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Insa y col. [24]	Vino	Est-DVB	Anisoles	<i>Volumen de muestra:</i> 50 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano
Dominguez y col. [26]	Vino blanco	Est-DVB	Fenoles volátiles	<i>Volumen de muestra:</i> 10 ml; <i>Disolvente:</i> diclorometano

EVB-DVB: Copolímero etilvinilbenceno-divinilbenceno; Est-DVB: Copolímero Estireno-divinilbenceno

II.3. Microextracción en fase sólida (SPME).

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica de extracción desarrollada por Pawliszyn [28-30] al inicio de los 90. Se basa en el establecimiento de un equilibrio de partición de los analitos entre una fase polimérica estacionaria, la cual cubre una fibra de sílice fundida, y la matriz de la muestra, figura II.2. Esta técnica no requiere el empleo de disolventes orgánicos, eliminando por tanto, todas las desventajas que esto conlleva. Es una técnica simple, rápida y barata en donde la extracción y la concentración se desarrollan de manera simultánea, figura II.3. Además sólo se requieren pequeños volúmenes de muestra. El dispositivo puede acoplarse fácilmente a un sistema de cromatografía gaseosa y, con algunas modificaciones, a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

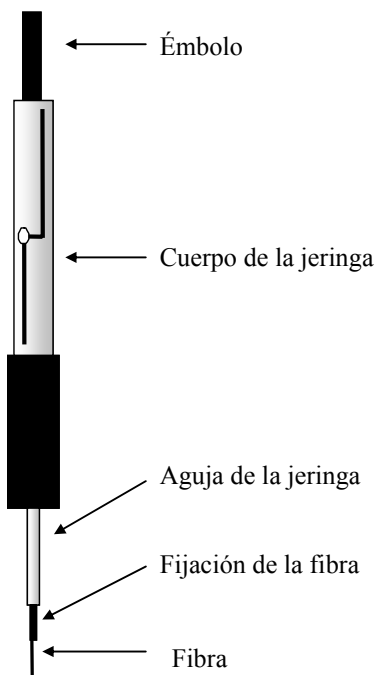


Figura II.2. Diagrama de un montaje de SPME

El dispositivo de SPME consiste en una pequeña fibra de sílice fundida (usualmente de 1 cm de longitud y 0.11 mm de diámetro interno), normalmente recubierto con una fase polimérica. A modo de protección, esta fibra está montada en un tipo de jeringa modificada o agarre, figura II.2. Los analitos son retenidos por la fibra hasta que el sistema alcanza el equilibrio.

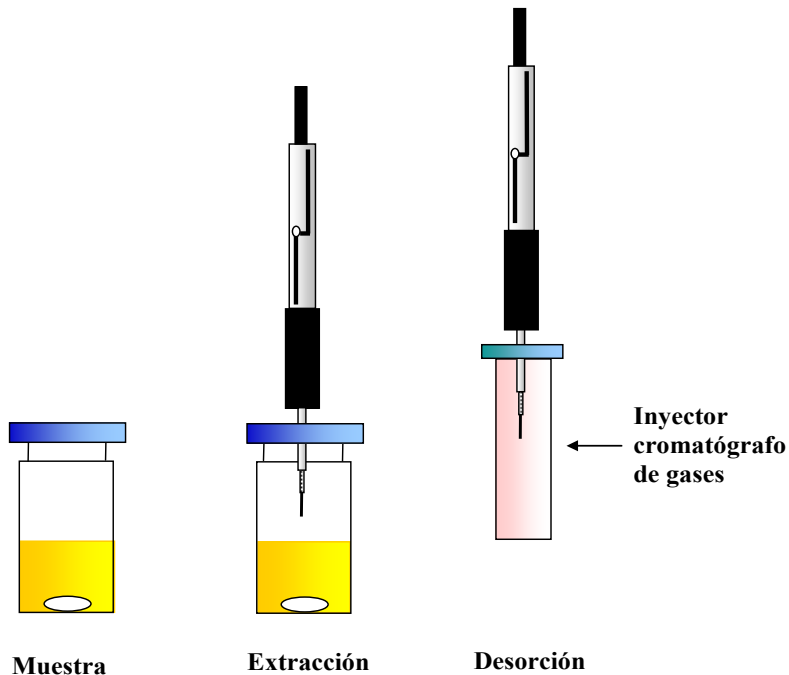


Figura II.3. Etapas del proceso de microextracción en fase sólida

La microextracción fase sólida está compuesta de dos etapas: extracción y desorción [7]. En la primera etapa, la muestra es depositada en un vial. El vial está sellado con un septum y una cápsula. La aguja de la jeringa con la fibra dentro perfora el septum. Entonces, la fibra se lleva a contacto con la fase acuosa o con el espacio de cabeza que existe sobre el líquido. Después de un tiempo predeterminado, la fibra es retirada y recogida dentro de la aguja y la jeringa se retira del vial de muestreo. En la fase de desorción, inmediatamente después, la jeringa se inserta en el inyector de un

instrumento analítico (GC o HPLC), donde los analitos se desorben térmicamente o bien a través de una disolución de fase móvil, de acuerdo con el instrumental técnico empleado. En esta etapa de desorción se emplean 1-2 minutos. En HPLC, el inyector estándar debe ser retirado empleando una instrumentación especial.

Existen tres tipos básicos de microextracción en fase sólida: extracción directa, extracción de espacio de cabeza, y extracción empleando una membrana protectora. La termodinámica predice los efectos producidos por determinadas condiciones de extracción en la distribución de los analitos entre la fibra y la matriz. Estos parámetros son los siguientes: el recubrimiento polimérico de la fibra, la temperatura y el tiempo de extracción, el efecto salino, el pH de la muestra, el volumen de la muestra, el volumen del espacio de cabeza, la agitación de la muestra, y la forma del vial. La naturaleza química del analito determina qué tipo de fase debe ser utilizada en la extracción. Actualmente, existen diversos tipos de fases estacionarias en el mercado, con diferentes espesores y polaridades que muestran afinidades por diferentes analitos. En la figura II.4 se indican las características de algunas de las fases más frecuentemente utilizadas [30]. El polidimetilsiloxano (PDMS) es una fase no polar que presenta gran afinidad por compuestos apolares, aunque puede ser utilizada para extraer compuestos moderadamente polares. El poliacrilato (PA) es una fase adecuada para compuestos más polares. Además de estos dos tipos generales de fase, se han desarrollado otros recubrimientos de materiales más específicos y fases mixtas que tienen propiedades complementarias a aquellos realizados con PDMS y PA. En este grupo se incluyen las fases de polidimetilsiloxano/polidivinilbenceno (PDMS/DVB); polietilenglicol/polidivinilbenceno (Carbowax/DVB), y Carboxen/PDMS. Estas fibras, más polares de las realizadas con PA, son adecuadas para extraer compuestos más polares como alcoholes y éteres. Además, las fibras de Carboxen/PDMS

tienen una superficie mayor y son adecuadas para la extracción de compuestos orgánicos volátiles (COVs).

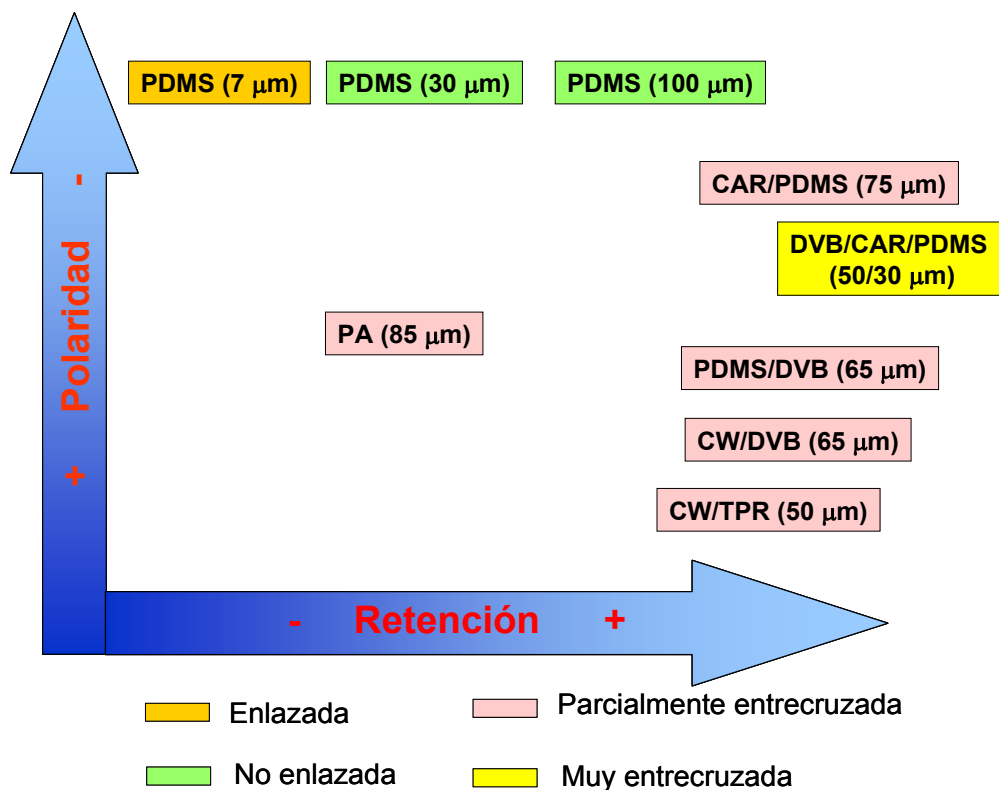


Figura II.4. Propiedades de las diferentes fases estacionarias empleadas en SPME [29]

La microextracción en fase sólida (SPME) está siendo utilizada en la actualidad de manera satisfactoria, en combinación con la cromatografía gaseosa y la cromatografía gaseosa aplicada espectrometría de masas, y se usa para gran variedad de compuestos en el análisis de vinagres y productos enológicos.

II.3.1. Aplicaciones de la SPME al estudio del aroma del vinagre.

La primera aplicación de la SPME al estudio de los compuestos volátiles en el vinagre, corresponde a Castro y col. [31, 32], que aplicaron la HS-SPME al análisis de los compuestos aromáticos en este producto enológico. La fibra empleada fue la CAR-PDMS que resultó ser más eficiente que otras fibras a la hora de extraer estos compuestos. La eficiencia de la extracción estaba afectada de manera inversa por el contenido de ácido acético; un aumento en la concentración de ácido acético disminuía la eficiencia de la extracción. No se observó interferencia con el aumento de contenido polifenólico. El método se aplicó a diferentes muestras de vinagre de vino de Jerez.

Tan importante como obtener una calidad específica de un vinagre es la necesidad de determinar de manera objetiva los parámetros apropiados que permiten caracterizar y diferenciar un vinagre de otro. Con este objetivo, Natera y col. [1] desarrollaron varias aproximaciones de reconocimiento de perfiles aromáticos que permitían clasificar las muestras de vinagres de acuerdo con su materia prima (vino, sidra, alcohol, etc.) y su proceso de producción, empleando diferentes parámetros analíticos, como el contenido polifenólico, los ácidos orgánicos, y los compuestos volátiles. La composición volátil se determinó mediante SPME y cromatografía gaseosa.

Pizarro y col. [33] también emplearon los compuestos volátiles para clasificar diferentes tipos de vinagre. Las señales cromatográficas recogidas fueron analizadas empleando un análisis lineal discriminante por pasos, para conseguir simultáneamente la selección y clasificación. Cocchi y col. [34] aplicaron un algoritmo de clasificación y selección basado en paquetes de ondas transformadas para la discriminación de vinagres balsámicos. Todas

las muestras fueron caracterizadas en base a sus perfiles de cromatografía gaseosa de la fracción volátil de espacio de cabeza, empleando SPME.

Los derivados furánicos son característicos del aroma acaramelado propio de los vinagres balsámicos tradicionales italianos. Se forman mediante reacciones de Maillard (o de pardeamiento no enzimático) entre azúcares reductores y aminoácidos, que ocurren durante la cocción del mosto de uva y durante el periodo de envejecimiento. La presencia del 2-furfural y del 5-metilfurfural en vinagres balsámicos es normal y algunos productores están interesados en la determinación del nivel de estas moléculas en el producto terminado, para evaluar diferentes propiedades organolépticas y detectar posibles fraudes comerciales. Giordano y col. [35] desarrollaron un método para la determinación del 2-furfural y del 5-metilfurfural en vinagres, usando HS-SPME-GC-MS. Se empleó una fibra DVB/CAR/PDMS y las condiciones de SPME se optimizaron estudiando el efecto de la fuerza iónica, el efecto de la temperatura y del tiempo de muestreo. Se realizó una calibración mediante dilución isotópica, empleando el 2-furfural-d4 (deuterado en la cuarta posición), evitando de esta forma el método de adiciones estándar.

II.3.2. Aplicaciones de la SPME al estudio del aroma del vino.

En 1997, De la Calle y col. [36] estudiaron diferentes fibras en la aplicación de la SPME para la extracción de compuestos en el bouquet del vino. Las fibras de poliacrilato (PA-85) consiguieron el perfil más completo del bouquet. Se identificaron alrededor de 90 sustancias mediante cromatografía gaseosa capilar-MS y se obtuvieron sus tiempos de retención para permitir la identificación de picos cromatográficos obtenidos por GC-FID. Posteriormente, se estudió y optimizó la microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza (headspace solid-phase microextraction, HS-SPME)

para emplearla con cromatografía gaseosa en el análisis de los compuestos aromáticos del vino [37] y los resultados fueron comparados con los obtenidos empleando el modo de muestreo directo (direct immersion solid-phase microextraction, DI-SPME) y la extracción líquido-líquido. Los datos obtenidos mediante la técnica HS-SPME-GC se aplicaron a la clasificación quimiométrica de variedades de vino. Los resultados obtenidos usando las tres técnicas fueron similares. Sin embargo, la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza presentó ventajas adicionales: una mayor sensibilidad en la determinación de terpenoides, siendo el tiempo de vida de la fibra SPME más de tres veces superior que en el muestreo directo, ya que la fibra no está en contacto con la matriz y, por tanto, no está contaminada por compuestos altamente polares, como el etanol y las sales.

Tat y col. [38] estudiaron la evolución en los últimos años de las diferentes fibras para la microextracción en fase sólida. Las fibras se evaluaron por su sensibilidad y repetibilidad; los resultados mostraron una notable diferencia en el comportamiento de las diferentes fases sólidas, tanto en el perfil cromatográfico, como en los diferentes niveles de concentración. La fibra más adecuada para el análisis de la fracción aromática de vinos en su totalidad fue la divinilbenceno/Carboxen/polidimetilsiloxano (DVM/CAR/PDMS). Para aplicaciones específicas, el uso de una fase sólida adecuada depende de la clase de compuestos a analizar.

Whiton y Zoecklein [39] estudiaron cómo podía afectarse la cuantificación por la matriz de la muestra y las condiciones de muestreo. Una serie de tests con soluciones modelo, que contenían un rango de volátiles típicos del vino, demostraron que el aumento de temperatura y el tiempo de muestreo podían incrementar la sensibilidad para los compuestos polares de alto punto de ebullición, pero que disminuía la sensibilidad para los más volátiles. La matriz de la muestra, así como la concentración de

etanol, también pueden tener diferentes efectos en las respuestas de los distintos compuestos. Es importante focalizar los analitos de interés cuando se están optimizando las condiciones de muestreo, y mantener estables esas condiciones óptimas para un tipo de compuestos, que no tienen por qué ser necesariamente las óptimas para otros.

Rocha y col. [40] estudiaron el comportamiento de la fibra SPME (poliacrilato) para distintos compuestos del aroma del vino (monoterpenoideos, alcoholes aromáticos y alifáticos y ésteres). Analizaron la repercusión de los cambios en la concentración de la matriz en el equilibrio de espacio de cabeza y, consecuentemente, en la absorción de la SPME de los diferentes componentes de la matriz. La cuantificación por SPME demostró estar altamente influida por la composición de la matriz; los compuestos con mayores factores de respuesta relativa fueron los menos afectados.

Liu y col. [41] desarrollaron un nuevo recubrimiento de SPME fabricado con metacrilato de butilo (BMA), divinilbenceno (DVB) y aceite de silicona con terminación hidroxílica (OH-TSO) con polimerización de radicales libres y sol-gel; se aplicó al análisis simultáneo de compuestos volátiles en vino tanto polares como no polares. Para estudiar el efecto matriz, se probaron diferentes matrices modelo de vino. Los efectos matriz fueron compensados usando el método del estándar interno y seleccionando un vino “libre de volátiles” como estándar de trabajo. El método mostró una linealidad, una precisión y unos límites de detección satisfactorios.

La SPME también ha sido aplicada para la determinación cuantitativa de ocho compuestos aromáticos presentes en un vino moscatel portugués [42] y para determinar los compuestos aromáticos de los vinos espumosos Cava (denominación de origen certificada) [43]. En este trabajo

se concluye que las cantidades de decanoato de etilo, 2-decanoato de etilo, succinato de dietilo, vitispirano, hexanoato de isoamilo, octanoato de isoamilo y octanoato de etilo podían ser marcadores de la edad legal límite de los Cavas. Los tres últimos compuestos también podían ser usados para determinar la edad aproximada de un vino espumoso.

Dado que la SPME es muy apropiada para las aplicaciones en el campo de los compuestos volátiles, esta técnica está siendo usada ampliamente para la caracterización de los vinos [44-53]. Bonino y col. [51] utilizaron la HS-SPME para la extracción de los compuestos aromáticos que caracterizan un vino del Piamonte (Ruché) derivado de un vino no aromático. Se demostró que era posible identificar una selección de 59 compuestos aromáticos primarios, relacionados con el típico aroma del Ruché. En base a los datos experimentales obtenidos, se atribuyó al hollejo de las uvas una gran importancia como fuente de los aromas varietales precursores, que se liberan fácilmente durante la maceración en presencia de enzimas de celulosa y pectinasa. Al usar la SPE y la SPME acoplada a la cromatografía gaseosa, fue posible la caracterización de la composición volátil de 23 vinos monovarietales de 13 variedades de uva tinta y blanca cultivados en la misma área [6]. El análisis quimiométrico de estos compuestos volátiles revela que son los compuestos terpénicos los que están más directamente relacionados con el aroma varietal, entre estos, específicamente el terpineol, linalool y geraniol. Los compuestos volátiles generados durante la fermentación alcohólica presentan una composición relativamente distinta dependiendo del tipo de fermentación llevada a cabo y, particularmente, dependiendo de si se ha realizado la maceración de las partes sólidas durante el proceso. En el caso de vinificación sin maceración, existe un relativo incremento de los ácidos grasos y de sus ésteres etílicos, mientras que en la vinificación con maceración los ésteres etílicos de los ácidos láctico, acético y succínico son los compuestos que están en mayor

abundancia. Marengo y col. [52] emplearon la SPME para analizar 68 muestras de vino del Piamonte (Italia). Se identificaron un total de 35 analitos. Se obtuvo la caracterización química de los diferentes vinos mediante métodos quimiométricos supervisados y no supervisados. También se usó un procedimiento de HS-SPME-GC para determinar la composición de la fracción volátil de muestras de vino blanco de diversas denominaciones de origen españolas. De acuerdo con los resultados obtenidos se consiguió diferenciar las distintas denominaciones de origen [53].

La técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza acoplada a cromatografía gaseosa con análisis de componentes principales (HS-SPME-GC-MS-PCA) se propuso para una distinción rápida de vinos basada en su perfil aromático [54]. El análisis de componentes principales (principal component analysis, PCA) se aplicó para extraer información química relevante mediante la selección de los fragmentos de masa más significativos (m/z) que proporcionaron la mejor distinción de los vinos. Rodríguez-Bencomo y col. [55, 56] han estudiado el perfil aromático de vinos dulces. Para la determinación de ésteres se seleccionó una fibra de PDMS-100, 40 minutos de extracción, la técnica de espacio de cabeza, agitación, saturación en cloruro sódico y viales de 16 ml. El contenido en azúcar no influenciaba la extracción, lo que permitió que esta técnica fuera aplicada a muestras de vino dulce. Sin embargo, para la determinación de los componentes mayoritarios se seleccionó una fibra CW-DVB. Al aplicar un PCA a los resultados obtenidos se consiguió diferenciar los vinos de acuerdo con el tipo de elaboración empleada.

Una nueva generación de fibra súper elástica DBV/CAR/PDMS de 50/30 micrómetros se empleó para la extracción en espacio de cabeza de analitos de muestras de vino de hielo, para la determinación de compuestos con un amplio rango de polaridades y volatilidades [57, 58]. Los perfiles de

los compuestos volátiles y semi-volátiles en diferentes muestras de vino de hielo canadiense y checo se compararon empleando PCA para la clasificación de los vinos de acuerdo con su origen, variedad de uva, procedimientos de fermentación o envejecimiento, utilizando roble o acero inoxidable durante el proceso de producción del vino; o las diferencias en el perfil aromático entre los vinos de hielo y los vinos de vendimia tardía.

En referencia a la investigación acerca de los procesos de vinificación, Riu-Aumatell y col. [59] estudiaron el desarrollo del aroma post fermentativo y su evolución en vinos cava durante largos periodos de envejecimiento en contacto con las lías (más de dos años). La extracción se llevó a cabo con dos fibras alternativas, la de PDMS y la fibra de triple fase DBV-CAR-PDMS. Aunque el perfil aromático obtenido a través de GC/MS fue similar, la fibra de triple fase demostró ser más adecuada para el estudio del desarrollo del perfil aromático durante el envejecimiento. Los acetatos de hexilo, 2-feniletilo e isoamilo disminuyeron de manera significativa a lo largo del tiempo, mientras que el 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftaleno (TDN), el vitispirano y el succinato de dietilo aumentaron de manera significativa durante el envejecimiento en contacto con las lías. Existen también otros autores que han aplicado la SPME al seguimiento de los compuestos volátiles durante la fermentación vínica [60-63].

El proceso del envejecimiento en vinos también ha sido estudiado empleando la microextracción en fase sólida. Carrillo y col. [64] desarrollaron un método de HS-SPME-GC/MS para el análisis cuantitativo de 14 compuestos volátiles en vinos tintos envejecidos en roble. Estos compuestos se forman y son extraídos por el vino cuando es envejecido en barriles de roble y son los responsables de las propiedades organolépticas particulares y de la alta calidad de estos vinos. Las variables de HS-SPME más importantes para mejorar el proceso de extracción se optimizaron

empleando la técnica del diseño experimental. Las condiciones seleccionadas fueron las siguientes: 10 ml de muestra en viales sellados de 20 ml añadiéndole un 30% de una disolución saturada de cloruro sódico, una fibra de DVB-CAR-PDMS, un tiempo de preincubación de diez minutos, una temperatura de 70°C, y un tiempo de extracción de 60 minutos sin agitación. Del mismo modo, la SPME se usó para determinar la facilidad de los ácidos cafeico y gálico para inhibir el descenso de los ésteres y terpenos volátiles durante el almacenamiento de un vino blanco y un vino modelo medio [65]. También se propuso la técnica HS-SPME para el análisis de los principales componentes volátiles, desde un punto de vista sensorial, presentes en madera de roble tostadas y no tostadas de diferentes orígenes [66]. Los resultados obtenidos consolidan esta técnica como apropiada para su uso en la caracterización de muestras de madera de roble de diferente procedencia y en la selección de la madera de roble más apropiada para envejecer vinos y espirituosos, en base a la composición química de las muestras de madera. Para el estudio de este tipo de compuestos, Carrillo y Tena [67] desarrollaron un método para la cuantificación mediante microextracción en fase sólida de espacio de cabeza múltiple (multiple headspace microextraction, MHS-SPME). Esta técnica se basa en la extrapolación hacia la extracción exhaustiva de los analitos a partir de extracciones consecutivas (tres o cuatro) de la misma muestra. El método se aplicó en el análisis de compuestos volátiles en virutas de roble empleadas para el envejecimiento acelerado de vinos propuesto como una alternativa al envejecimiento tradicional en barriles de madera [68].

La SPME ha sido comparada con diferentes técnicas de separación. Por ejemplo, Castro y col. [69] compararon la mencionada técnica con la extracción líquido-líquido rotatoria y continua (liquid-liquid extraction, LLE) y aplicaron las dos técnicas al análisis de compuestos volátiles en vino fino de Jerez. Se obtuvieron las condiciones óptimas para extraer estos

compuestos empleando las dos técnicas, siendo ambos métodos validados. No se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos, a un nivel de significación del 5%. El procedimiento por LLE resultó ser un método con un alta repetibilidad y ofrecía la posibilidad de extraer varias muestras simultáneamente (hasta doce); sin embargo la técnica SPME es un método que no utiliza disolvente y, por tanto, presenta mayores ventajas, como un volumen de muestra pequeño y una mayor sensibilidad y simplicidad. Bohlscheid y col. [70] compararon la SPME con la SPE empleando resina Amberlite XAD-2 para la extracción de los compuestos volátiles. Tanto la HS-SPME como la XAD-2 presentaron similitudes en el análisis de vino Riesling; sin embargo, el método de microextracción no requería disolventes orgánicos y era generalmente más rápido de realizar.

Otro aspecto importante en el uso de la microextracción en fase sólida para el análisis de volátiles en vino es su aplicación a la determinación de terpenos y compuestos similares. Peña y col. [71] desarrollaron un método para el análisis de diversos terpenos en muestras de vino empleando SPME y GC-MS. Los mejores resultados se obtuvieron mediante la inmersión directa de la fibra, empleando un periodo de muestreo de quince minutos con agitación magnética constante. También estos autores [72] compararon este método con la extracción asistida por ultrasonidos (ultrasound assisted extraction, UAE). La aplicación de ambos métodos para muestras de vino tinto demostró que la UAE proporcionaba mejores extracciones de los compuestos monoterpénicos que la SPME; mientras que la SPME se transforma en una alternativa atractiva debido a su velocidad, su requerimiento de bajo volumen de muestra y no emplear de disolventes. Cámara y col. [73] desarrollaron un método basado en HS-SPME para la determinación de niveles traza de compuestos terpenoideos en mostos y vinos de Madeira, un vino licoroso con un contenido alcohólico del 18% (v/v). Los mejores resultados se obtuvieron empleando una fibra de

poliacrilato de 85 μm , con un tiempo de espacio de cabeza de 60 minutos para el mosto y 120 minutos para las muestras de vino. Se analizaron 36 muestras de vino de Madeira, procedentes de variedades de uva blanca, para estimar la fracción libre de monoterpenos y norisoprenoideos C13 [74].

Además del uso del SPME para el análisis de familias de compuestos, como los terpenos, esta técnica también se usa en vinos para el análisis específico de compuestos individuales que tienen particular importancia, por diferentes razones, en el control de los procesos de vinificación. Hayasaka y Bartowsky [75] desarrollaron un método para analizar diacetil, uno de los compuestos aromáticos importantes tanto en productos lácteos como en vino. La presencia de diacetil en vinos normalmente está asociada con la fermentación maloláctica, un proceso que puede ocurrir a la vez o después de la fermentación alcohólica.

II.3.3. Aplicaciones de la SPME al estudio de los aromas indeseables en vinos.

Con respecto al uso de la SPME en este ámbito, se ha descrito su aplicación a compuestos azufrados. Los compuestos volátiles de azufre juegan un papel muy importante en la calidad del aroma de alimentos y bebidas. Se encuentran comúnmente en alimentos que están en malas condiciones, proporcionándoles un olor indeseable. Desde el punto de vista tecnológico, estos compuestos, cuando están presentes en vinos son considerados usualmente como “off-flavours”, significando que las condiciones bajo las que los vinos han sido producidos son erróneas. Mestres y col. [76] llevaron a cabo varios estudios en donde aplicaban la SPME para el análisis de estos compuestos en vinos. La técnica HS-SPME se ha combinado con la cromatografía gaseosa acoplada a la detección de fotometría de llama (flame photometric detection, FPD) para analizar

sulfuros y disulfuros volátiles. En uno de los estudios [77] se concluyó que la fibra CAR-PDMS era más eficiente que otras fibras, como PDMS o PA, a la hora de extraer; sin embargo, su repetibilidad era peor. En otro estudio [78] analizaron simultáneamente sulfuros y disulfuros en el aroma del vino, aplicando una trampa criogénica para resolver los problemas causados por una desorción pobre de los compuestos azufrados más volátiles. También analizaron los compuestos azufrados orgánicos de baja volatilidad en el vino mediante la mencionada técnica de SPME [79, 80]. Del mismo modo, Fang y Qian [81] desarrollaron un método para el análisis de estos compuestos basado en SPME y cromatografía gaseosa con detección fotométrica de llama a pulsos (pulse flame photometric detection, PFPD). Esta técnica se comprobó que era muy sensible a los compuestos de azufre, y emplea una llama a pulsos en lugar de una llama continua, como en la detección fotométrica tradicional, para conseguir generar una llama quimioluminiscente. Del mismo modo, se cuantificaron por HS-SPME trece compuestos de azufre, usualmente considerados como posibles off-flavours, “u olores indeseables”, en 80 vinos aparentemente sin este defecto, de cuatro variedades y cinco vendimias producidos en el Trentino (región del norte de Italia) [82]. Del mismo modo, López y col. [83] desarrollaron un método basado en el muestreo automático mediante HS-SPME de pequeños volúmenes de vino, empleando fibras de CAR-PDMS y la posterior determinación cuantitativa, mediante GC-PFPD, de los compuestos azufrados altamente volátiles presentes en vino. Este método fue menos sensible al efecto matriz.

En el caso de los fenoles volátiles, Martorell y col. [84] desarrollaron un método de análisis de etilfenoles en vino tinto empleando la SPME. Las fibras que se usaron estaban recubiertas con 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS). Castro y col. [85] optimizaron un método de SPME para etilfenoles y vinilfenoles en vinos tintos y vinos blancos. La fibra más eficiente para la

extracción de estos compuestos resultó ser la Carbowax-divinilbenceno (CW-DVB), figura II.5.

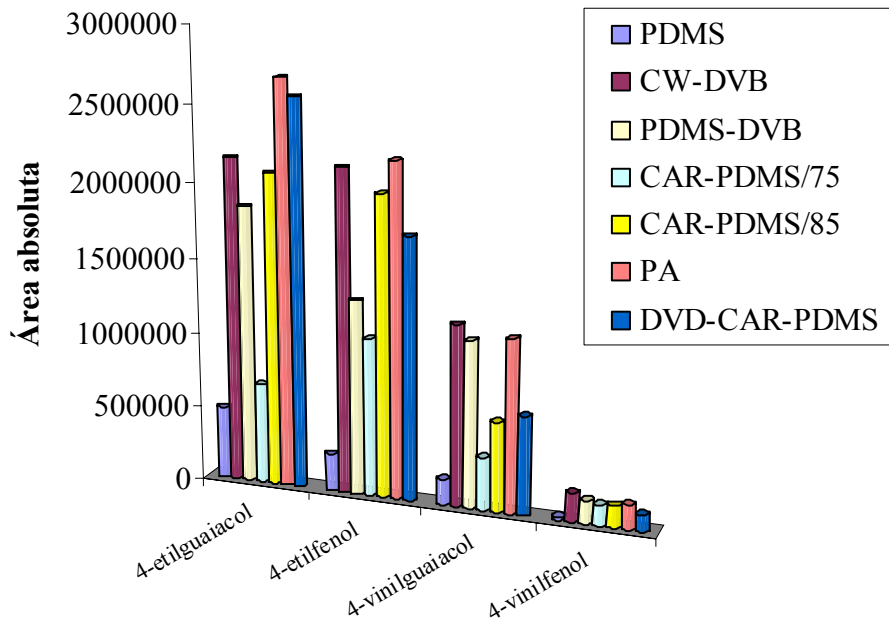


Figura II.5. Estudio de las fibras. Áreas de pico (valor medio) obtenidas para cada fenol volátil.

Las metoxipiracinas son unos compuestos extremadamente aromáticos que se encuentran en vegetales como pimientos Bell y habichuelas francesas, y son unos compuestos muy importantes para el aroma de las uvas en variedades como el Cabernet Sauvignon o Sauvignon blanc. Presentan un olor vegetal herbáceo, similar al pimiento Bell, y tienen un umbral de detección muy bajo, entre 1 y 10 ng/l en agua. Sala y col. [86] han desarrollado un método para la determinación de 3-alkil-2-metoxipiracinas en mostos mediante cromatografía gaseosa con detección de fósforo-nitrógeno (nitrogen-phosphorus detection, NPD) empleando HS-

SPME. Consiguieron recuperaciones altas, límites de detección a niveles de 0.1-1 ng/l y un rango lineal de 2-100 ng/l. Este método fue aplicado a mosto experimental de Cabernet Sauvignon y Merlot, y se realizó el seguimiento de los analitos durante la maduración y la vendimia. En otro estudio, estos autores emplearon la misma técnica después de una extracción de las muestras empleando la destilación para eliminar el alcohol y otros compuestos volátiles que pudieran interferir en la SPME [87].

La microextracción en fase sólida con dilución isotópica estable se ha aplicado para la cuantificación de metoxipiracinas en vinos [88, 89]. Ryan y col. [90] optimizaron un método de HS-SPME para la determinación de metoxipiracinas en vino. El análisis se llevó a cabo empleando cromatografía gaseosa en dos dimensiones con posibilidades de detección novedosas tales como la detección fósforo-nitrógeno (GCxGC-NPD) o la espectrometría de masas mediante tiempo-de-vuelo (time-of-flight) (GCxGC-TOFMS). Finalmente se empleó la dilución isotópica estable para la cuantificación de 2-metoxi-3-(2-metilpropil)pirazina (IBMP), empleando como patrón interno la 2-(2H3)metoxi-3-(2-metilpropil)pirazina. Ambas técnicas fueron muy sensibles, alcanzando límites de detección para la IBMP de 0.5 y 1.95 ng/l respectivamente. La cuantificación de la IBMP en vino Sauvignon blanc mediante las dos técnicas proporcionó concentraciones comparables, indicando que el método HS-SPME no estaba afectado por el efecto matriz del vino.

En referente al análisis de compuestos de la contaminación de corcho, existen varios ejemplos del uso de la SPME para este fin [91-109]. Martínez-Uruñuela y col. [100, 101] optimizaron una reacción de acetilación para la derivatización de clorofenoles empleando un diseño Doehlert para su aplicación directa en muestras de vino. El objetivo final de esta reacción es transformar los clorofenoles en compuestos menos polares, para, de esta

forma aumentar su resolución cromatográfica. En las reacciones de derivatización, los clorofenoles pueden ser transformados en sus correspondientes ésteres, empleando para ello anhídrido acético. También Pizarro y col. [102] han usado un método de microextracción en fase sólida con derivatización sobre la fibra para la determinación directa de haloanisoles y halofenoles en vino. Insa y col. [103] desarrollaron y aplicaron dos metodologías basadas en SPE y SPME acopladas a la cromatografía gaseosa con detección de captura electrónica para determinar TCA, TeCA y PCA en macerados de corcho y en muestras de vino. Para ello, evaluaron un cartucho C18 y un absorbente basado en estireno-divinilbenceno bajo diferentes condiciones experimentales. Además, optimizaron un método de SPME empleando una fibra de PDMS para conseguir las mejores condiciones de extracción para los compuestos clorofenólicos. Los mismos autores [104] realizaron un estudio comparativo para comprobar el efecto matriz en la extracción de tres clorofenoles en vino sintéticos y comerciales (vinos blancos y tintos). El efecto matriz también fue estudiado por Vlachos y col. [105] y Pizarro y col. [106], que encontraron desviaciones significativas en el análisis cuantitativo. Gómez-Ariza y col. [107] compararon la MHS-SPME y la GC-MS con varias metodologías analíticas basadas en la “pervaporación”, una técnica innovativa basada en el uso de membranas similar al espacio de cabeza dinámico. En esta metodología, la introducción de la membrana contribuye a la eliminación de la matriz antes del paso de absorción; en la MHS, las múltiples extracciones en las que se ve envuelto el proceso reducen el efecto matriz. En el 2006, Riu y col. [108] desarrollaron un método para la cuantificación de los cloroanisoles endógenos totales en los diferentes tipos de corchos empleando una fibra de SPME de 50/30 μm del tipo divinilbenceno/carboxen/ polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), y cromatografía gaseosa con detección de captura de electrones. El método se aplicó al análisis de la cantidad total de cloroanisoles en diferentes tipos de

taponos de corcho (natural, aglomerados, y taponos de vino espumoso) [109].

La SPME también ha sido usada para cuantificar, mediante calibración interna, 18 moléculas que son de interés porque han sido identificadas como las responsables de un gran número de inconvenientes encontrados en la industria vinica de hoy día [110]. Del mismo modo, se desarrolló un método para el análisis simultáneo de compuestos volátiles responsables de olores indeseables en vinos con taponos de corcho [111].

II.3.4. Aplicaciones de la SPME al estudio del aroma de otros productos.

La SPME también ha sido aplicada al estudio de los compuestos volátiles del brandy. El aroma de brandy está influenciado por el medio ambiente en el que crecen las uvas, la variedad de uva, la maduración de la uva, los procesos de fermentación, las condiciones de destilación y, fundamentalmente, la duración de los procesos de envejecimiento y la temperatura de envejecimiento, del mismo modo que del uso de barriles de roble y la humedad relativa en la bodega. Ebeler y col. [112] emplearon la microextracción en fase sólida para el análisis de la composición volátil del brandy, comparando los resultados a los obtenidos a través del procedimiento tradicional de extracción continua líquido-líquido. Además se usó una combinación de SPME con GC-olfatometría para suministrar una información más detallada de las características sensoriales de los brandies varietales.

Watts y Butzke [113] aplicaron la SPME para cuantificar las concentraciones de metilcetona en un gran número de Cognacs comerciales, para encontrar las correlaciones posibles con otros volátiles y para confirmar

la idoneidad de las metilcetonas como un grupo de compuestos que permiten asegurar la calidad de estos productos. Poco después, los mismos autores [114] utilizaron un método de SPME y GC-MS y regresión por mínimos cuadrados parciales (parcial least squares, PLS) para predecir la edad de la muestra y separar Cognacs de diferentes edades empleando sólo las áreas de los picos cromatográficos. El método utilizó 17 volátiles (13 ésteres etílicos y 4 metilcetonas) y pudo predecir la edad de la muestra con un alto grado de precisión.

La SPME también ha sido aplicada a la determinación de compuestos volátiles y semi volátiles para diferentes bebidas alcohólicas: cerveza y whisky [115].

II.4. Extracción por absorción en barra agitadora (SBSE).

La técnica denominada extracción por absorción en barra agitadora (SBSE) se basa (al igual que la SPME) en el uso de un polímero absorbente apolar, el polidimetilsiloxano (PDMS), como medio de extracción de los analitos de muestras líquidas y gaseosas. El PDMS presenta una serie de características que lo hacen ser el material absorbente más comúnmente usado para este tipo de técnicas. Entre ellas destacan su carácter inerte, lo que reduce el riesgo de que se generen compuestos sobre su superficie; que es bastante fácil de sintetizar, por lo que las diferencias entre los diferentes fabricantes en cuanto a consistencia y reproducibilidad son mínimas; o que los productos de degradación son bastante fáciles de identificar por espectrometría de masas.

La SBSE no es la primera técnica que se basa en el uso del PDMS como medio de extracción. Antes que ella se desarrollaron varias técnicas. En primer lugar se desarrolló la trampa tubular abierta (open tubular

trapping, OTT) [116]. En esta técnica se utiliza una especie de columna capilar abierta, con PDMS en su pared interna. Posteriormente se desarrolló la anteriormente mencionada SPME [117] que basa su funcionamiento, como ya hemos explicado, en que el PDMS se disponía en la superficie de una aguja de un dispositivo parecido a una jeringa. Y más adelante, pero previa a la SBSE, se desarrolló la extracción en fase de goma (gum-phase extraction, GPE), basada en el uso de unos lechos empaquetados formados de partículas 100% de PDMS [118].

Finalmente, a principios de los 90 se desarrolló el método de extracción por absorción en barra agitadora (SBSE), con la sensibilidad de los lechos empaquetados de PDMS, y con el rango de aplicación (en términos de volatilidad) de la SPME [119]. Se incorporaron unas barras agitadoras a un tubo de vidrio con un diámetro externo de 1,2 mm, y recubierto con una capa de 1 mm de PDMS, proporcionando una anchura total a la barra agitadora de 3,2 mm de diámetro externo. Las barras agitadoras se introducen en las muestras acuosas y la extracción tiene lugar mediante agitación de la barra en el interior del líquido (figura II.6).

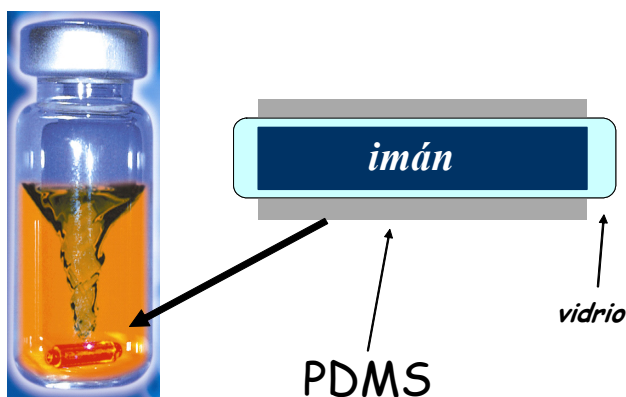


Figura II.6. Esquema de la forma de las barras agitadoras y del proceso de extracción

La cantidad de PDMS puede variar con la longitud, típicamente de 10 mm (55 μl de PDMS) hasta 40 mm (219 μl de PDMS) las cuales se aplican respectivamente a pequeños y grandes volúmenes.

Después de un determinado tiempo de agitación, la barra se saca de la muestra, se introduce en un tubo de vidrio y se transfiere a un instrumento de desorción térmica, donde los analitos son térmicamente retirados de la barra. Posteriormente ocurre un proceso de crioconcentración (normalmente con nitrógeno líquido), para que los analitos vuelvan a ser reconcentrados antes de entrar en el cromatógrafo. De esta forma se consiguen picos analíticos mucho más estrechos. Finalmente, y tras un golpe de calor, los analitos son transferidos al cromatógrafo de gases acoplado a detección con espectrometría de masas (figura II.7)

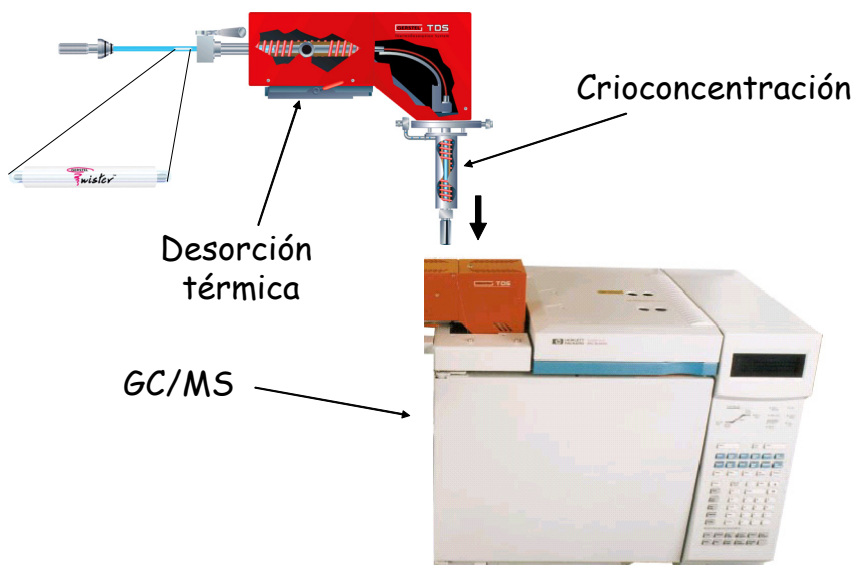


Figura II.7. Esquema de la transferencia de los analitos al GC.

La SBSE presenta una serie de ventajas claras frente al resto de las técnicas extractivas estudiadas en el presente capítulo. Para empezar, no emplea disolventes, al contrario que la SPE. Esto conlleva varias ventajas adicionales como son que las muestras, al no entrar en contacto con ningún disolvente, tienen menor posibilidad de contaminación o de formación de artefactos durante el proceso de extracción. También, por esta misma razón, es una técnica mucho más agradecida con el medio ambiente, ya que no genera residuos de ningún tipo. Otra ventaja que posee, es su elevado grado de automatización, lo que la hace una técnica sencilla de usar, rápida y repetitiva. Además, casi no requiere manipulación de la muestra por parte del analista, ni precisa de tratamiento de muestra previo. Esto hace que la posibilidad de error analítico disminuya enormemente. Comparándola con la SPME, la SBSE presenta una mayor sensibilidad analítica, es decir alcanza límites de detección y cuantificación mucho más bajos. Esto se debe a que en la SBSE la cantidad de PDMS empleada es bastante superior, por lo que la capacidad extractiva también lo es.

En contrapartida, y debido también al uso del PDMS, la SBSE presenta una clara desventaja frente a otras técnicas extractivas. Esta es la capacidad limitada de extracción que posee sobre sustancias polares, dado el marcado carácter apolar del PDMS, único absorbente utilizado hasta la fecha. Este problema se palia en cierto modo gracias a que la cantidad de PDMS usada en la técnica es muy elevada, por lo que, aunque en menor medida, también se logran extraer sustancias con carácter polar. Otra desventaja de la técnica es que, debido a su naturaleza, se precisa de un proceso previo de optimización, tanto de las condiciones de extracción (tiempo de extracción, velocidad de agitación, temperatura, etc.) como de las condiciones de desorción (temperatura de desorción, tiempo de desorción, temperatura de crioconcentración, etc.) para cada caso concreto. Esto hace

que carezca de la posibilidad de una aplicación inmediata a un caso que no haya sido previamente estudiado.

II.4.1. Aplicaciones de la SBSE al estudio del aroma del vinagre.

La primera referencia donde se aplica la SBSE a muestras de vinagre, para el estudio de compuestos volátiles, se debe a Ochiai y col. [120]. En este trabajo, se aborda el estudio de conservantes en diferentes muestras de alimentos incluyendo vinos blancos y tintos y vinagres balsámicos. Se examinaron las condiciones de extracción: pH, volumen de muestra, temperatura de extracción, adición de sal y tiempo de extracción. El método fue posteriormente validado, obteniéndose rangos lineales y sensibilidades, 10 veces superiores a las de otras técnicas analíticas que tampoco emplean disolvente, como la electroforesis capilar.

Más tarde, Pfannkoch y Whitecavage [121] aplicaron la SBSE-GC-MS al estudio de la determinación de los compuestos volátiles propios del aroma del vinagre balsámico entre otras matrices. Gracias al uso de esta técnica, se eliminaban las interferencias y problemas derivados de la presencia de los componentes más polares de la matriz.

En 2006, aparece en la bibliografía una nueva aplicación de la SBSE, donde se propone y evalúa un método de análisis de compuestos volátiles en vinagres [122], y que se tratará en profundidad en el capítulo III. Se optimizaron, usando herramientas quimiométricas, tanto las condiciones analíticas de extracción, como las de desorción. Se llegó a que las mejores condiciones analíticas de extracción eran: 25 ml de muestra sin dilución, agitándose durante 120 minutos a 1250 rpm, y añadiéndole a cada muestra 5,85 g de NaCl. Por otra parte, las condiciones analíticas óptimas de desorción fueron: una temperatura de desorción de 300°C, manteniendo esta

temperatura máxima durante 10 minutos, un flujo de helio de 75 ml/min durante este proceso, y una temperatura de -140°C en la crioconcentración posterior. Con este método se obtuvieron valores adecuados de rango lineal y de límites de detección para el estudio de los compuestos volátiles presentes en el vinagre. En un estudio posterior [123], que se explicará en detalle en el capítulo IV, se validó el método y se comparó esta metodología con otra basada en la SPME [31, 32]. El número de compuestos estudiados se incrementó en este segundo estudio. Se obtuvieron para la SBSE límites de detección y cuantificación menores y una mejor repetibilidad y reproducibilidad. También se obtuvieron mejores sensibilidades debido a su mayor capacidad de extracción.

Un nuevo trabajo sobre análisis de volátiles en vinagres, empleando técnicas analíticas de extracción, fue llevado a cabo por Callejón y col. [124]. En este caso, se empleó como extensión de la SBSE, la llamada extracción adsorptiva de espacio de cabeza (headspace sorptive extraction, HSSE), desarrollada por Tiepont y col. [125]. Esta variación se basa en que la barra agitadora no se introduce en el seno de la disolución a analizar, sino que se sitúa en el espacio de cabeza, donde los analitos son igualmente retenidos por el PDMS, figura II.8. Los autores desarrollaron un método analítico, para la determinación de compuestos volátiles en vinagres de vino tinto y vinagres de Jerez, usando la mencionada técnica. Se optimizaron las condiciones de extracción, empleando un diseño central compuesto, y posteriormente, el método fue analíticamente validado. Los límites de detección y cuantificación obtenidos, no fueron tan bajos como los que proporciona la SBSE, pero se alcanzaron valores de recuperación similares y niveles de repetibilidad y reproducibilidad bastante buenos.

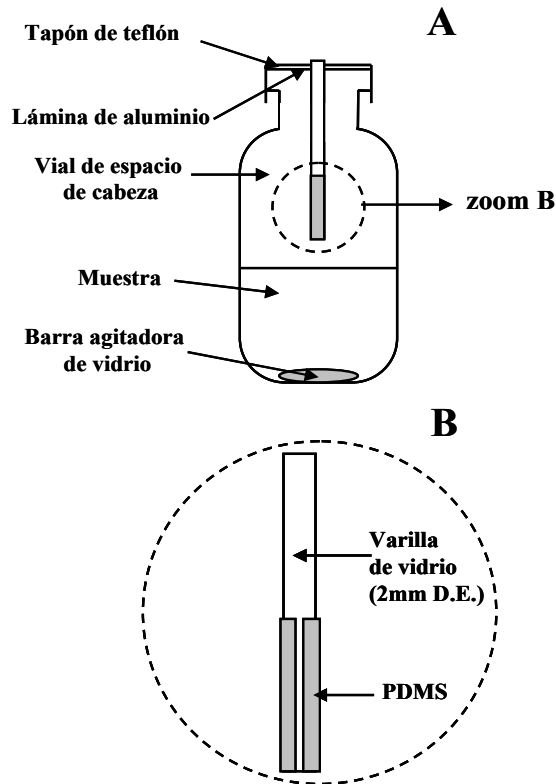


Figura II.8. Esquema del muestreo de la HSSE. Vial de espacio de cabeza (A) y detalle de la barra HSSE-PDMS (B).

Posteriormente, los mismos autores aplicaron el método optimizado, al estudio de la evolución de los compuestos volátiles durante la acetificación de diferentes vinagres de vinos tintos, obtenidos mediante acetificación en cultivo superficial y en cultivo sumergido [126]. Obtuvieron que los ésteres acéticos eran los compuestos predominantes en los vinagres obtenidos por cultivo superficial, mientras que en los obtenidos mediante cultivo sumergido, los compuestos mayoritarios eran los ácidos.

II.4.2. Aplicaciones de la SBSE al estudio del aroma de otros productos.

La mayoría de las aplicaciones de esta técnica a la determinación de compuestos volátiles en otros productos enológicos se centran, fundamentalmente, en el vino como objetivo del análisis (tanto blanco como tinto, y de diferentes denominaciones de origen). Además del vino, también existen algunos estudios que hacen referencia a las uvas y al mosto.

Debido a su influencia negativa en el aroma, el análisis de los TCA en vinos empleando la SBSE ha sido estudiado por varios autores [127-129]. En un estudio llevado a cabo por Zalacaín y col. [129], no sólo se estudió la presencia del 2,4,6-tricloroanisol, sino que se desarrolló un método de análisis que carecía de etapa de preconcentración y con un tiempo de análisis relativamente corto (2 horas), para la detección y cuantificación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA), 2,3,4,5-tetracloroanisol (TeCA), 2,3,4,5,6-pentacloroanisol (PCA) y sus fenoles respectivos en muestras de vino tinto y blanco. Las condiciones de extracción optimizadas fueron 10 ml de muestra, agitados a 700 rpm durante una hora, a temperatura ambiente y ajustando el pH a 3.6. Se lograron valores de detección y cuantificación inferiores a los que había hasta ese momento, con concentraciones menores a sus valores umbrales de detección olfativa.

Otro estudio reciente realizado por Lorenzo y col. [130] se centraba en la presencia de halofenoles y haloanisoles en productos enológicos, más concretamente en tapones de corcho usados para el embotellamiento de vinos, llevado a cabo mediante HSSE, la variación de espacio de cabeza de la SBSE. Para la optimización de las condiciones de extracción, los autores inyectaron una disolución de 2,4,6-tricloroanisol en vino sintético, en el extremo de un tapón de corcho. Se llegó a que los mejores resultados se

obtenían después de someter a los corchos adicionados a 100°C durante una hora, seguido de 30 minutos de tiempo de estabilización a temperatura ambiente. El método mostraba una buena linealidad en el rango de 1-70 ng/g, y unos coeficientes de correlación de 0,90 a 0,99, además de valores aceptables de reproducibilidad y repetibilidad. En relación al análisis de los cloroanisoles y los clorofenoles en productos enológicos, se ha aplicado directamente a material de corcho [131].

El análisis de los compuestos volátiles en vino utilizando la SBSE, se ha estudiado de diversas formas. Se ha aplicado a vinos envejecidos en barriles de madera de roble [132], al estudio de los aromas primarios del vino [133] o al estudio del posible efecto de la maduración de la uva en el aroma del vino [134]. Díez y col. [135] pusieron a punto un método de análisis usando la SBSE para la cuantificación de los fenoles volátiles 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 4-vinilfenol y 4-vinilguaiacol. Estos compuestos son los causantes de alteraciones negativas producidas en el aroma del vino. Las condiciones de extracción optimizadas para este caso fueron: dilución de la muestra, 1:4, como volumen de muestra se tomaron 15 ml de vino diluido, 60 minutos de tiempo de extracción con una velocidad de agitación de 900 rpm y sin la adición de NaCl a las muestras. El método fue validado analíticamente, obteniéndose buenos valores, tanto de r^2 (superiores a 0,9964), como de linealidad, RSD, recuperación, sensibilidad, o límites de detección y cuantificación. Se usó exclusivamente el modo SIM (selected ion monitoring) para la cuantificación, lo que contribuía a disminuir los límites de detección. El método optimizado se aplicó a varias muestras de vinos tintos y blancos y vino fino de Jerez.

La SBSE también ha sido usada junto a la SPME. Alves y col. realizaron una caracterización del perfil aromático del vino de Madeira, usando conjuntamente estas dos técnicas, ambas acopladas a GC-MS [136].

Mientras que la SPME era usada para identificar los componentes mayoritarios del aroma del vino de Madeira, la SBSE, dada su mayor sensibilidad, era usada para la determinación de los componentes minoritarios del aroma, que juegan un papel muy importante en la complejidad aromática del citado vino, teniendo una gran importancia en el bouquet. Dentro de las familias de compuestos que fueron estudiadas mediante la SBSE, encontramos ésteres, ácidos carboxílicos, alcoholes, aldehídos, piranos, lactonas, monoterpenos, sesquiterpenos y norisoprenoideos C13. Los autores encontraron que existía una correlación excelente entre el envejecimiento del vino y la abundancia del compuesto denominado cis-roblelactona, por lo que se conseguía un importante descriptor para caracterizar vinos de Madeira envejecidos, además de contribuir al aroma del vino. Los resultados obtenidos mediante SBSE permitieron diferenciar diferentes tipos de vinos de Madeira empleando para ello el contenido en compuestos volátiles.

Komes y col. [137] realizaron un estudio comparativo para ver cuál era la técnica de extracción que mejor sustituía a la comúnmente usada extracción líquido-líquido con 1,1,1-triclorofluorometano, a la hora de aislar los compuestos volátiles del vino blanco para después analizarlos por cromatografía gaseosa. Se compararon la SPME y la SBSE, además de la extracción líquido-líquido. Los autores encontraron que, aunque tanto la SBSE como la SPME permitían la posibilidad de la automatización usando un pequeño tamaño de muestra y una manipulación rápida y sencilla, la recuperación de los compuestos aromáticos se veía restringida, dadas las propiedades de discriminación de la fase polimérica. No obstante, los resultados obtenidos por SBSE eran más parecidos a los de la extracción líquido-líquido que los obtenidos por SPME.

Kittel y col. [138, 139] estudiaron, usando la SBSE acoplada a cromatografía de gases-olfatometría (GC-O), una serie de vinos en los que se habían detectado cambios no deseados relacionados con el aroma. El aroma “no típico” del envejecimiento (untypical aging, UTA), como es comúnmente llamado, se produce debido a cambios oxidativos en los compuestos aromáticos del vino y es muy común encontrarlo en diferentes tipos de vinos europeos. Los autores, gracias a la aplicación de la SBSE, llegaron a la conclusión de que, aunque el UTA podía aparecer en vinos americanos, no era debido a la presencia de los compuestos que se pensaba, puesto que se encontraban por debajo del límite de detección de la técnica.

Centrando el estudio a los compuestos volátiles presentes en las uvas de partida, Salinas y col. aplicaron la SBSE a la evolución de los compuestos volátiles durante la maduración de uvas de la variedad Monastrell [140].

Luan y col. [141] aplicaron la técnica a diferentes variedades de uva durante la maduración de las mismas para el análisis de monoterpenos, más concretamente, metabolitos del linalool y del citronellol. Los autores hicieron uso de la SBSE para el análisis de los compuestos que tenían menor concentración, del orden de las ppb, mientras que para el resto de los compuestos usaron la extracción en fase sólida como método de aislamiento.

Dado que entre los analitos estudiados por los autores existían varios estereoisómeros, se usó la técnica de cromatografía gaseosa multidimensional enantioselectiva con detección por espectrometría de masas acoplada a los procedimientos de extracción previamente nombrados. Con esta técnica los autores consiguieron separar los estereoisómeros de los metabolitos estudiados, usando para ello una segunda columna quiral con una ciclodextrina modificada como fase estacionaria, figura II.9, siendo capaces de determinar las relaciones estereoisoméricas de los analitos

estudiados, lo que puede ser interesante para el control de autenticidad del aroma de la uva o del vino. Se trata de la primera referencia encontrada en la bibliografía donde se usa la SBSE acoplada a un sistema cromatográfico multidimensional, que ha permitido dilucidar dos vías de reacción diferentes para la formación de algunos analitos claves en la maduración de la uva.

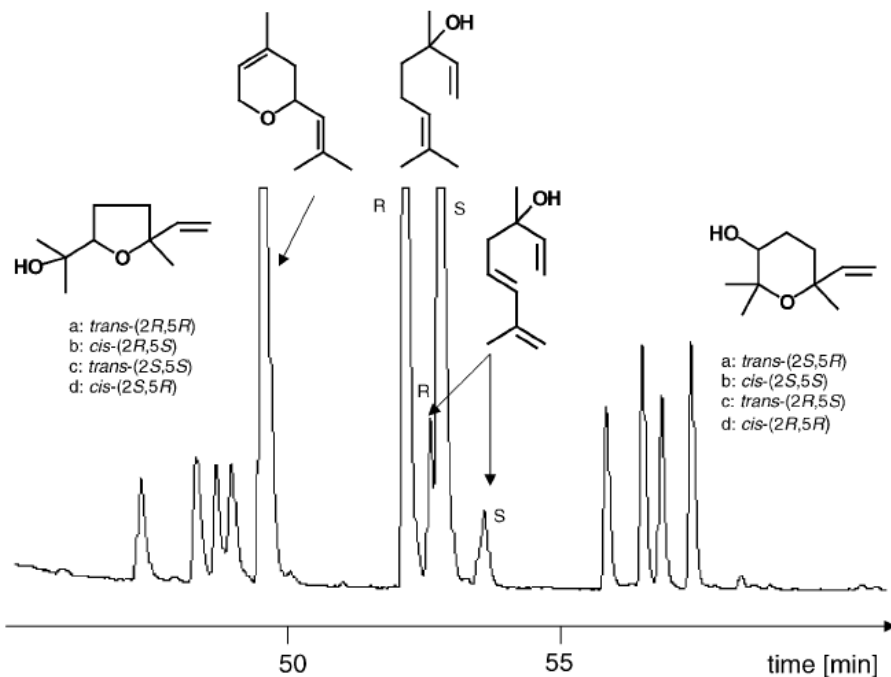


Figura II.9. Cromatograma de columna de segunda dimensión ilustrando la separación de una mezcla de patrones (en el orden de sus tiempos de elución): óxido de linalool furánico, óxido de nerol, linalool, hotrienol, óxido de linalool piránico [141].

Un nuevo trabajo publicado referente a SBSE y compuestos volátiles en productos enológicos lo llevaron a cabo Caven-Quantrill y Buglass [142]. Los autores realizan una comparación de la técnica SBSE con la tradicional extracción-destilación simultánea (simultaneous distillation-extraction, SDE) para el análisis de compuestos volátiles en mosto de uva. Las condiciones de

extracción y de desorción del método SBSE se optimizaron usando un mosto sintético y fueron las siguientes: para la extracción se usó un tiempo de agitación de 2 horas a 1000 rpm; para el proceso de desorción se utilizó por un lado una temperatura final de desorción de 300°C (5 min) y un flujo de helio de desorción de 70 ml/min, y por otra, en el sistema de trampa criogénica, una temperatura de crioconcentración de -50°C y una temperatura final de 260°C (20 min). Los autores, al realizar la comparación de ambos métodos, encontraron que con la SBSE se obtenían valores de recuperación y de reproducibilidad más bajos que con la SDE, sin embargo, el primero de los métodos resultaba ser bastante más sensible, identificándose 126 compuestos volátiles en muestras de mosto reales frente a los 98 encontrados con la SDE, además de las ventajas ya conocidas como son la rapidez y la sencillez de los análisis, la automatización y la no necesidad de disolventes.

En la siguiente tabla se muestran algunas de las condiciones analíticas empleadas por los diferentes autores para el análisis de los compuestos volátiles en las diferentes matrices estudiadas. Tabla II.2.

Tabla II.2. SBSE (*: HSSE). Condiciones analíticas empleadas para el análisis de compuestos volátiles en productos enológicos.

Autores	Matriz	Analitos	Condiciones analíticas de la extracción.
Ochiai y col. [120]	Vino y vinagre balsámico	Conservantes	<i>Volumen de muestra:</i> 10 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 1000 rpm; <i>temperatura de extracción:</i> 25°C; <i>tiempo de extracción:</i> 120 min.; <i>pH:</i> 1.5; adición de NaCl
Pfannkoch y col. [121]	Vinagre balsámico	Aroma	-
Durán y col. [122, 123]	Vinagre	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 25 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 1250 rpm; <i>tiempo de extracción:</i> 120 min.; adición de NaCl
Callejón y col.* [124, 126]	Vinagre	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 5 ml; <i>tiempo de extracción:</i> 60 min.; <i>temperatura de extracción:</i> 62°C
Sponholz y col. [127]	Vino	2,4,6-Tricloroanisol	-
Hayasaka y col. [128]	Vino	2,4,5-Tricloroanisol; aroma; agroquímicos	<i>Volumen de muestra:</i> 10 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 700 rpm; <i>tiempo de extracción:</i> 90 min.; <i>temperatura de extracción:</i> 25°C
Zalacain y col. [129]	Vino	Cloroanisoles	<i>Volumen de muestra:</i> 10 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 700 rpm; <i>tiempo de extracción:</i> 60 min.; <i>temperatura de extracción:</i> temperatura ambiente; <i>pH:</i> 3.6
Lorenzo y col.* [130]	Tapones de corcho	Halofenoles y haloanisoles	<i>Temperatura de extracción:</i> 100°C; <i>tiempo de extracción:</i> 60 min.; <i>tiempo de estabilización:</i> 30 min.
Callejón y col. [131]	Tapones de corcho	Cloroanisoles y clorofenols	<i>Extracción previa:</i> 24 horas empleando 75%-etanol/25%-agua. <i>Volumen de muestra:</i> 1 ml de extracto diluido; <i>velocidad de agitación:</i> 700 rpm; <i>dilución de la muestra:</i> 1:10; <i>tiempo de extracción:</i> 60 min.; <i>pH:</i> 3.6
Marín y col. [132]	Vino envejecido en roble	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 25 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 700 rpm; <i>tiempo de extracción:</i> 90 min.; <i>temperatura de extracción:</i> temperatura ambiente
Zalacain y col. [133]	Vino	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 25 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 700 rpm; <i>temperatura de extracción:</i> 60°C; <i>tiempo de extracción:</i> 90 min.
Fang y col. [134]	Vino	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 10 ml de vino diluido; <i>velocidad de agitación:</i> 1000 rpm; <i>dilución de la muestra:</i> 1:2; <i>tiempo de extracción:</i> 12 horas; adición de NaCl
Díez y col. [135]	Vino	Fenoles volátiles	<i>Volumen de muestra:</i> 15 ml de vino diluido; <i>velocidad de agitación:</i> 900 rpm; <i>dilución de la muestra:</i> 1:4; <i>tiempo de extracción:</i> 60 min.
Alves y col. [136]	Vino	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 10 ml de diluido; <i>velocidad de agitación:</i> 800 rpm; <i>temperatura de extracción:</i> 20°C; <i>dilución de la muestra:</i> 1:2; <i>tiempo de extracción:</i> 60 min.
Komes y col. [137]	Vino	Aroma	-
Kittel y col. [138, 139]	Vino	Aromas indeseables	-
Salinas y col. [140]	Uvas	Aroma	-Maceración. <i>Cantidad de muestra:</i> 200 g.; <i>tiempo de maceración:</i> 120 min -Extracción. <i>Cantidad de muestra:</i> 100 ml de uva triturada diluida; <i>velocidad de agitación:</i> 700 rpm; <i>dilución de la muestra:</i> a 1 L.; <i>tiempo de extracción:</i> 360 min.
Luan y col. [141]	Uvas	Monoterpenos	<i>Velocidad de agitación:</i> 450 rpm; <i>temperatura de extracción:</i> temperatura ambiente; <i>tiempo de extracción:</i> 30 min.; <i>pH:</i> 4
Caven-Quantrill and Buglass [142]	Mosto	Aroma	<i>Volumen de muestra:</i> 20 ml; <i>velocidad de agitación:</i> 1000 rpm; <i>temperatura de extracción:</i> temperatura ambiente; <i>tiempo de extracción:</i> 120 min.

II.5. Bibliografía.

- [1] R. Natera, R. Castro, M.V.G. Moreno, M.J. Hernández, C.G. Barroso, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3345.
- [2] M.L. Morales, G.A. González, J.A. Casas, A.M. Troncoso, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2001) 676.
- [3] S.J. Lee, D. Rathbone, S. Asimont, R. Adden, S.E. Ebeler, *Am. J. Enol. Vitic.* 55 (2004) 346.
- [4] P. Hernández-Orte, M.J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira, *Food Chem.* 89 (2005) 163.
- [5] C. Plata, J.C. Mauricio, C. Millan, J.M. Ortega, *World J. Microb. Biot.* 21 (2005) 115.
- [6] Z. Piñeiro, R. Natera, R. Castro, M. Palma, B. Puertas, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 165.
- [7] R. Cela, R.A. Loreno, M.C. Casais, “*Técnicas de separación en Química Analítica*”. Síntesis, Madrid, 2002.
- [8] L. Culleré, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 1017 (2003) 17.
- [9] M. Charles, B. Martin, C. Ginies, P. Etievant, G. Coste, E. Guichard, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 70.
- [10] M.L. Morales, B. Benítez, A.M. Troncoso, *Food Chem.* 88 (2004) 305.
- [11] E. Durán, F. Chinnici, N. Natali, R. Natera, C. Riponi, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3030.
- [12] K. Wada, T. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4362.
- [13] R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 167.
- [14] C.G. Edwards, R.B. Beelman, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 216.

- [15] A. Genovese, R. Dimaggio, M.T. Lisanti, P. Piombino, L. Moio, *Annali di Chimica* 95 (2005) 383.
- [16] I. Lukic, M. Banovic, D. Persuric, S. Radeka, B. Sladonja, J. *Chromatogr. A* 1101 (2006) 238.
- [17] V. Ferreira, L. Ortega, A. Escudero, J. Cacho, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 469.
- [18] S. C. Dieguez, L.D. Díaz, M.L. De la Peña, E.F. Gómez Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 35 (2002) 452.
- [19] S. Karagiannis, A. Economou, P. Lanaridis, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5369.
- [20] Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 209.
- [21] V. Ferreira, R. López, J. Cacho, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1659.
- [22] V. Ferreira, I. Jarauta, L. Ortega, J. Cacho, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 147.
- [23] E. Campo, J. Cacho, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 180.
- [24] S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 235.
- [25] L. Culleré, J. Cacho, V. Ferreira, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 51.
- [26] C. Domínguez, D.A. Guillén, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 95.
- [27] J. Casas, “III Jornadas Universitarias sobre el Jerez”. En: “Proceedings of the University of Cadiz”, Jimenez-Mena (Ed). University of Cadiz Press, Cadiz, 1985, pág: 333.
- [28] J. Pawliszyn, “Solid Phase Microextraction. Teory and Practice”, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [29] J. Pawliszyn, “Applications of solid phase microextraction”, Royal Society of Chemistry Chromatography Monographs, Cambridge, 1999.
- [30] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.

- [31] R. Castro, R. Natera, M.V.G. Moreno, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 953 (2002) 7.
- [32] R. Natera, R. Castro, M.V.G. Moreno, F.G. Rowe, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 967 (2002) 261.
- [33] C. Pizarro, I. Esteban-Díez, C. Sáenz-González, J.M. González-Sáiz, Anal. Chim. Acta 608 (2008) 38.
- [34] M. Cocchi, C. Durante, G. Foca, D. Manzini, A. Marchetti, A. Ulrici, Chemom. Intell. Lab. Syst. 71 (2004) 129.
- [35] L. Giordano, R. Calabrese, E. Davoli, D. Rotilio, J. Chromatogr. A 1017 (2003) 141.
- [36] D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.-H. Feller, J. High Resol. Chromatogr. 20 (1997) 665.
- [37] D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.-H. Feller, J. High Resol. Chromatogr. 21 (1998) 373.
- [38] L. Tat, P. Comuzzo, I. Stolfo, F. Battistutta, Food Chem. 93 (2005) 361.
- [39] R.S. Whiton, B.W. Zoecklein, Am. J. Enol. Vitic. 51 (2000) 379.
- [40] S. Rocha, B. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5142.
- [41] M. Liu, Z. Zeng, Y. Tian, Anal. Chim. Acta 540 (2005) 341.
- [42] L.M.T. Vaz, A.M. Costa, A.M. Relva, J. Microcol. Sep. 13 (2001) 236.
- [43] S. Francioli, M. Guerra, E. López-Tamames, J.M. Guadayo, J. Caixach, Am. J. Enol. Vitic. 50 (1999) 404.
- [44] D. Favretto, G. Grandis, G. Allegri, P. Traldi, Rapid Commun. Mass Spectrom. 12 (1998) 1595.
- [45] D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartsch, K.-H. Feller, Fresenius J. Anal. Chem. 360 (1998) 784.

- [46] J. Weber, M. Beeg, C. Bartsch, K.-H. Feller, D. De la Calle, M. Reichenbacher, K. Danzer, J. High Resol. Chromatogr. 22 (1999) 322.
- [47] G. Vas, K. Koteleky, M. Farkas, A. Dobó, K. Vékey, Am. J. Enol. Vitic. 1 (1998) 100.
- [48] M.A. Pozo-Bayón, E. Pueyo, P.J. Martín-Álvarez, M.C. Polo, J. Chromatogr. A 922 (2001) 267.
- [49] J.C.R. Demyttenaere, C. Dagher, P. Sandra, S. Kallithraka, R. Verhé, N. De Kimpe, J. Chromatogr. A 985 (2003) 233.
- [50] M. Begala, L. Corda, G. Podda, M.A. Fedrigo, P. Traldi, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 1086.
- [51] M. Bonino, R. Schellino, C. Rizzi, R. Aigotti, C. Delfini, C. Baiocchi, Food Chem. 80 (2003) 125.
- [52] E. Marengo, M. Aceto, V. Maurino, J. Chromatogr. A 943 (2001) 123.
- [53] J.M. Jurado, O. Ballesteros, A. Alcázar, F. Pablos, M.J. Martín, J.L. Vilchez, A. Navalón, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 961.
- [54] S.M. Rocha, P. Coutinho, A. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 188.
- [55] J.J. Rodríguez-Bencomo, J.E. Conde, M.A. Rodríguez-Delgado, F. García-Montelongo, J.P. Pérez-Trujillo, J. Chromatogr. A 963 (2002) 213.
- [56] J.J. Rodríguez-Bencomo, J.E. Conde, F. García-Montelongo, J.P. Pérez-Trujillo, J. Chromatogr. A 991 (2003) 13.
- [57] L. Setkova, S. Risticovic, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 1147 (2007) 224.
- [58] J.L. Giraudel, L. Setkova, J. Pawliszyn, M. Montury, J. Chromatogr. A 1147 (2007) 241.
- [59] M. Riu-Aumatell, J. Bosch-Fusté, E. López-Tamames, S. Buxaderas, Food Chem. 95 (2006) 237.

- [60] E. Vianna, S.E. Ebeler, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 589.
- [61] A. Mallouchos, M. Komaitis, A. Koutinas, M. Kanellaki, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3840.
- [62] A. Mallouchos, M. Komaitis, A. Koutinas, M. Kanellaki, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2402.
- [63] R. Flamini, A. Dalla Vedova, A. Panighel, N. Perchiazzi, S. Ongarato, *J. Mass Spectrom.* 40 (2005) 1558.
- [64] J.D. Carrillo, A. Garrido-López, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 25.
- [65] I. Lambropoulos, I.G. Roussis, *Food Res. Int.* 40 (2007) 176.
- [66] M.C. Diaz-Maroto, E. Sánchez-Palomo, M.S. Pérez-Coello, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6857.
- [67] J.D. Carrillo, M.T. Tena, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 937.
- [68] R. Bozalongo, J.D. Carrillo, M.A. Fernández, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 10.
- [69] R. Castro, R. Natera, P. Benitez, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 141.
- [70] J.C. Bohlschheid, X.-D. Wang, D.S. Mattinson, C.G. Edwards, *J. Food Quality* 29 (2006) 1.
- [71] R.M. Peña, J. Barciela, C. Herrero, S. García-Martín, *J. Sci. Food Agric.* 85 (2005) 1227.
- [72] R.M. Peña, J. Barciela, C. Herrero, S. García-Martín, *Talanta* 67 (2005) 129.
- [73] J.S. Camara, M.A. Alves, J.C. Marques, *Anal. Chim. Acta* 555 (2006) 191.
- [74] J.S. Camara, M.A. Alves, J.C. Marques, *Food Chem.* 101 (2007) 475.
- [75] Y. Hayasaka, E.J. Bartowsky, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 612.
- [76] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 211.

- [77] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 835 (1999) 137.
- [78] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 849 (1999) 293.
- [79] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 881 (2000) 583.
- [80] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 945 (2002) 211.
- [81] Y. Fang, M.C. Qian, J. Chromatogr. A 1080 (2005) 177.
- [82] B. Fedrizzi, F. Magno, D. Badocco, G. Nicolini, G. Versini, J. Agric. Food Chem. 55 (2007) 10880.
- [83] R. López, A.C. Lapeña, J. Cacho, V. Ferreira, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 8.
- [84] N. Martorell, M.P. Martí, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 975 (2002) 349.
- [85] R. Castro, R. Natera, M.V.G. Moreno, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 995 (2003) 11.
- [86] C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 880 (2000) 93.
- [87] C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 953 (2002) 1.
- [88] D.M. Chapman, J.H. Thornagate, M.A. Matthews, J.-X. Guinard, S.E. Ebeler, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 5431.
- [89] C. Prouteau, R. Schneider, Y. Lucchese, F. Nepveu, R. Renard, C. Vaca-García, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 223.
- [90] D. Ryan, P. Watkins, J. Smith, M. Allen, P. Marriott, J. Sep. Sci. 28 (2005) 1075.
- [91] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, J. Chromatogr. A 786 (1997) 293.
- [92] R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, J.M. Bayona, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 3509.

- [93] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 1.
- [94] S. Jönsson, T. Usitalo, B. Van Bavel, I.-B. Gustafsson, G. Lindström, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 71.
- [95] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 369.
- [96] E. Lizarraga, A. Irigoyen, V. Belsue, E. González-Peñas, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 145.
- [97] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 49.
- [98] O. Ezquerro, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 201.
- [99] S. Insa, E. Besalú, C. Iglesias, V. Salvadó, E. Anticó, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 627.
- [100] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 141.
- [101] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 31.
- [102] C. Pizarro, N. Pérez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 26.
- [103] S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 15.
- [104] S. Insa, E. Besalú, V. Salvadó, E. Anticó, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 722.
- [105] P. Vlachos, A. Kampioti, M. Kornaros, G. Lyberatos, *Food Chem.* 105 (2007) 681.
- [106] C. Pizarro, N. Pérez-del-Notario, J.M. González-Sáiz, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 1.
- [107] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, R. Beltrán, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 133.
- [108] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 240.

- [109] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 310.
- [110] S. Boutou, P. Chatonnet, *J. Chromatogr. A* 1141 (2007) 1.
- [111] P.V. Neto, S.M. Rocha, A.J.D. Silvestre, *J. Sci. Food Agric.* 87 (2007) 632.
- [112] S.E. Ebeler, M.B. Terrien, C.E. Butzke, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 625.
- [113] V.A. Watts, C.E. Butzke, *J. Sci. Food Agric.* 83 (2003) 1143.
- [114] V.A. Watts, C.E. Butzke, R.B. Boulton, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7738.
- [115] F. Rodrigues, M. Caldeira, J.S. Camara, *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 82.
- [116] C. Bicchi, A. D'Amato, F. David, P. Sandra, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989) 316.
- [117] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- [118] E. Baltussen, H.G. Janssen, P. Sandra, C.A. Cramers, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 395.
- [119] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C.A. Cramers, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737.
- [120] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 56.
- [121] E. Pfannkoch, J. Whitecavage, (2003) *LCGC North America* 37.
- [122] E. Durán Guerrero, R. Natera Marín, R. Castro Mejías, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 47.
- [123] E. Durán Guerrero, R. Natera Marín, R. Castro Mejías, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 18.
- [124] R.M. Callejón, A.G. González, A.M. Troncoso, M.L. Morales, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 93.
- [125] B. Tiepont, F. David, C. Bicchi, P. Sandra, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 577.

- [126] R.M. Callejón, W. Tesfaye, M.J. Torija, A. Mas, A.M. Troncoso, M.L. Morales, *Food Chem.* 113 (2009) 1252.
- [127] W.R. Sponholz, A. Hoffmann, F. David, P. Sandra, *Mitteilungen Klosterneuburg* 51 (2001) 248.
- [128] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [129] A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 173.
- [130] C. Lorenzo, A. Zalacain, G.L. Alonso, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 250.
- [131] R.M. Callejon, A.M. Troncoso, M.L. Morales, *Talanta* 71 (2007) 2091.
- [132] J. Marín, A. Zalacain, C. De Miguel, G.L. Alonso, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 1.
- [133] A. Zalacain, J. Marín, G.L. Alonso, M.R. Salinas, *Talanta* 71 (2007) 1610.
- [134] Y. Fang, M.C. Quian, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8567.
- [135] J. Díez, C. Domínguez, D.A. Guillén, R. Veas, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 263.
- [136] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 11.
- [137] D. Komes, D. Ulrich, T. Lovric, K. Schippel, *Vitis* 44 (2005) 187.
- [138] K.M. Kittel, E.H. Lavin, K.D. Deibler, A. Maillard, T.E. Acree, *Abstracts of Papers, 224th ACS National Meeting, 2002.*
- [139] K.M. Kittel, E.H. Lavin, K.D. Deibler, T.E. Acree, A. Maillard, *Food Sci. Tech.* 131 (2004) 455.
- [140] M.R. Salinas, A. Zalacain, F. Pardo, G.L. Alonso, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 4821.
- [141] F. Luan, A. Mosandl, M. Gubesch, M. Wüst, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 369.

- [142] D.J. Caven-Quantrill, A.J. Buglass, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 121.

DESARROLLO DE METODOLOGÍA

ANALÍTICA



III OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR ABSORCIÓN EN BARRA AGITADORA (SBSE) APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINAGRES.

III.1. Introducción.

El aroma del vinagre depende de las materias primas (vinos blancos y tintos, sidra, malta, miel, etcétera), los constituyentes formados durante la fermentación y, en algunos casos, las sustancias generadas durante el envejecimiento, por tanto, es lógico suponer que los vinagres pueden ser caracterizados y diferenciados por el análisis cualitativo y cuantitativo de sus componentes volátiles.

Todavía hoy, la extracción y concentración de los componentes del aroma, previo a su análisis mediante cromatografía gaseosa, constituye un problema que no ha sido todavía resuelto satisfactoriamente. Desde hace pocos años viene incrementándose un interés en desarrollar nuevas técnicas analíticas para el seguimiento de los compuestos volátiles en una amplia variedad de matrices. En la bibliografía podemos encontrar varios métodos para el análisis mediante cromatografía gaseosa capilar [1-5]. La tendencia va encaminada a desarrollar metodologías precisas, fáciles de automatizar, y sensibles que reduzcan la manipulación de la muestra. La preparación de la muestra para el análisis mediante cromatografía gaseosa de los compuestos menos volátiles se ha llevado a cabo principalmente por extracción líquido-líquido [1] o extracción en fase sólida [2]. Los compuestos más volátiles normalmente son analizados mediante métodos de espacio de cabeza o purga y trampa [3, 6]. Otras técnicas de preparación empleadas incluyen la extracción mediante fluidos supercríticos [7], y la extracción simultánea de

destilación de disolvente [8], entre otras. Todos estos métodos de preparación de muestra presentan varias desventajas, como el excesivo coste y tiempo, la posible generación de artefactos, etc.

La extracción por absorción en barra agitadora (SBSE) es una técnica recientemente desarrollada [9-12] en donde una barra agitadora recubierta con 50-300 μl de polidimetilsiloxano (PDMS) se emplea para extraer analitos de una amplia variedad de matrices. El mecanismo de extracción es similar al de la microextracción fase sólida (SPME) basado en la absorción del PDMS [13]. La barra agitadora magnética se añade a la muestra para promover la transferencia de analitos del recubrimiento polimérico y, después de un periodo de extracción predeterminado, los analitos son desorbidos térmicamente en el inyector del cromatógrafo.

La ventaja de la SBSE es la mayor cantidad disponible de PDMS, lo que se traduce en altas recuperaciones y una mayor capacidad de muestra. Las aplicaciones desarrolladas con SBSE han mostrado bajos límites de detección y buenas repetibilidades [12, 14, 15], lo que confirma el gran potencial de esta técnica. En el presente capítulo se describe la optimización de un método de extracción por absorción en barra agitadora acoplado a un procedimiento de desorción térmica seguido del análisis mediante cromatografía gaseosa con detección de espectrometría de masas para la determinación de compuestos volátiles en vinagre.

Los parámetros que afectan a la extracción de los analitos del vinagre por la barra agitadora de PDMS y las condiciones que afectan a la desorción térmica se estudiaron empleando una aproximación quimiométrica basada en el uso de una serie de experimentos (diseño de experimentos) que permite la variación simultánea de todos los factores experimentales estudiados y la distinción de las interacciones entre ellos, que cuales no se

detectan con los métodos experimentales clásicos [16, 17]. Para el paso de la extracción, se evaluaron los efectos de parámetros experimentales tales como el volumen de muestra, el efecto de saturación de sal, la velocidad de agitación, el tiempo de muestreo y la dilución de la muestra. Para la desorción dentro del cromatógrafo de gases, los factores que fueron evaluados fueron la temperatura de desorción, el tiempo de desorción, el flujo de helio y la temperatura de crioconcentración dentro del inyector PTV.

En ambos casos, los efectos de estos parámetros fueron evaluados empleando un diseño factorial de dos niveles expandido posteriormente a un diseño central compuesto. Esta herramienta quimiométrica es muy apropiada en experimentos de barrido donde el objetivo es investigar factores influyentes y/o su interacción. La yuxtaposición de un diseño de dos niveles con un diseño de estrella (los centros de estos dos diseños coinciden) nos proporciona el diseño compuesto. Es una de los diseños más empleados para la estimación de la superficie de respuesta multifactor [16, 17], que mantiene como mínimo el número de experimentos mientras que nos proporciona la información necesaria.

III.2. Materiales y métodos.

III.2.1. Muestras de vinagre.

Se utilizó un vinagre comercial para la realización de los diferentes estudios de optimización, tanto de las condiciones de extracción como de las de desorción. Con posterioridad a la optimización, se usaron varios vinagres de diferente procedencia para analizarlos mediante esta metodología.

III.2.2. Patrones y reactivos.

Todos los patrones de los compuestos volátiles usados en el estudio fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), y por Sigma (Steinheim, Alemania). Se usó el 4-metil-2-pentanol como patrón interno. El NaCl fue suministrado por Scharlau (Barcelona, España).

III.2.3. Preparación de las muestras.

Las extracciones se llevaron a cabo con barras agitadoras denominadas comercialmente Twister, recubiertas de un polímero absorbente denominado PDMS (polidimetilsiloxano) de un tamaño de 10 mm de longitud y 0,5 mm de anchura. Fueron proporcionadas por Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Alemania). Después de la optimización y para cada análisis de SBSE, se pipetearon 25 ml de muestras (tanto vinagre natural como artificial) y se llevaron a un matraz erlenmeyer de 100 ml con 5,85 g de NaCl y 50 µl de disolución de 4-metil-2-pentanol (2,27 g/l en agua Milli-Q conteniendo 80 g/l de ácido acético). El matraz erlenmeyer se situó en un agitador magnético de 15 posiciones (Mülheim a/d Ruhr, Alemania). La barra agitadora se sometió a agitación a 1250 rpm durante 120 minutos, a una temperatura de 25°C. Después de sacarlo de la muestra de vinagre, la barra se enjuagaba durante unos segundos con agua destilada para eliminar los restos de sal y se secaba suavemente usando papel de celulosa. Después, se introducía la barra en un tubo de cristal para llevar a cabo el proceso de desorción térmica.

III.2.4. Instrumental.

Las barras agitadoras fueron desorbidas térmicamente usando una unidad de desorción térmica TDS-2 (Gerstel) que se encontraba conectada

por una línea de transferencia de calor a un inyector de vaporización por temperatura programada (PTV) denominado comercialmente Cis-4 (Gerstel). El PTV estaba instalado en un sistema Agilent modelo 6890 GC-5973N MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). En el inyector PTV se usó un liner vacío. La unidad de termodesorción estaba equipada con un automuestreador MPS 2L (Gerstel) con capacidad de muestrear hasta un total de 98 barras agitadoras. La temperatura de desorción se programó desde 40°C hasta 300°C (manteniendo esta temperatura durante 10 minutos) a una velocidad de 60°C/min bajo flujo de helio (75 ml/min) y los analitos desorbidos fueron crioconcentrados en el sistema PTV con nitrógeno líquido a -140°C. Finalmente el sistema PTV se programó desde -140°C hasta 300°C (manteniendo durante 5 minutos esta temperatura) a una velocidad de 10°C/s para el análisis por GC-MS. Los análisis de GC-MS capilar en el modo de impacto electrónico se llevaron a cabo usando un Sistema Agilent 6890 GC-5973N MS (Agilent, Little Falls, DE, EE.UU.) equipado con una columna capilar DB-Wax (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 60 m x 0.25 mm de diámetro interno, con un recubrimiento de 0.25 µm. El gas portador fue el helio, usando un flujo de 1 ml/min. El horno de cromatografía gaseosa fue programado como se explica a continuación: mantenimiento a 35°C durante 10 minutos, en ese momento se producía una rampa de temperatura de 5°C/min hasta llegar a 100°C. A continuación se alcanzaban los 210°C a una velocidad de 3°C/min y se mantenían durante 40 minutos. El detector de masas operó en modo EI+ a 70eV con un rango de 30 a 400 uma.

La identificación de los picos se llevó a cabo usando la librería Wiley por analogía con los espectros de masas y fueron confirmados gracias a los índices de retención de los patrones, cuando fue posible, o con los datos de retención encontrados en la bibliografía. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa del ion

molecular de cada compuesto, en relación a la del 4-metil-2-pentanol, el patrón interno.

III.2.5. Diseño de experimentos.

El objetivo del análisis de datos en un diseño de experimentos es calcular y evaluar una lista de los principales efectos y las interacciones entre ellos, apoyadas por una tabla de ANOVA, indicando cuáles de los efectos son significativos. Para la evaluación de los datos se usó el paquete estadístico “Statgraphics Plus 5.0” para Windows 98.

En este estudio se eligió una exploración secuencial de la respuesta que se realizó en dos partes. En la primera fase se deseaba establecer la influencia relativa de los factores estudiados y sus interacciones respecto al número de picos cromatográficos observados y al área cromatográfica total obtenida. Se seleccionaron cinco factores que potencialmente podían afectar a la extracción por SBSE: tiempo de extracción, volumen de muestra, velocidad de agitación, efecto de la fuerza iónica al añadir diferentes cantidades de NaCl y dilución de la muestra

Este último factor fue considerado teniendo en cuenta que la presencia de la matriz de la muestra puede cambiar, no sólo el coeficiente de distribución, sino también el tiempo de equilibrio en la extracción adsorbtiva [13]. En vinos, el contenido de etanol se ha visto que interfiere en la técnica de SPME [18-20]. Dado que el ácido acético es uno de los principales constituyentes del vinagre, puede competir con los compuestos volátiles en la extracción. En la bibliografía [4] los datos demuestran que aunque las áreas cromatográficas totales disminuyen con el aumento del contenido de ácido acético, la relación área del compuesto/área del patrón interno permanecía constante, por lo que la concentración de ácido acético no

afectaba a los datos analíticos. Por otro lado, los análisis se simplifican enormemente cuando las muestras pueden ser diluidas ya que se evitan picos saturados, pero se requieren métodos de detección de elevada sensibilidad.

Consecuentemente, se eligió un diseño factorial 2^{5-1} . Este diseño consta de 16 experimentos realizados de manera aleatoria para proporcionar protección contra el efecto de las variables “lurking”, variables ocultas. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Los valores correspondientes a los puntos altos (+) y bajos (-) para cada factor se muestran en la tabla III.1.

Tabla III.1. Niveles de los factores. Optimización de las condiciones de extracción.

Factor	Bajo (-)	Alto (+)	Centro	Axial ($-\alpha$)	Axial ($+\alpha$)
Volumen de muestra (ml)	20	40			
Velocidad de agitación (rpm)	500	1500	1000	190	1800
Tiempo de extracción (min)	30	120	75	2.5	147
NaCl (M)	2.0	4.0	3.0	1.4	4.6
Dilución	0.0	1.0	0.5	0.0	1.3

En la segunda fase este diseño factorial de dos niveles se expandió a un diseño en forma de estrella. Se obtuvo un diseño central compuesto (CCD, con $\alpha = 1.607$) y los centros de los dos diseños por separado coincidían. La tabla 1 enumera los valores dados a cada factor.

Después se optimizaron las condiciones de desorción en el TDS siguiendo un procedimiento similar (diseño factorial de 2^4 y luego un diseño central compuesto con $\alpha = 1.078$). En este caso se seleccionaron cuatro

factores: temperatura de desorción, tiempo de desorción, flujo de helio y temperatura de crioconcentración

La tabla III.2 muestra los valores asignados a cada factor.

Tabla III.2. Niveles de los factores. Optimización de las condiciones de desorción.

Factor	Bajo (-)	Alto (+)	Centro	Axial (- α)	Axial (+ α)
T ^a de desorción (°C)	250	330	290	247	333
Tiempo de desorción (min)	4	12			
Flujo de helio (mL min ⁻¹)	50	150			
T ^a de crioconcentración (°C)	-150	-10	-80	-155.5	-4.5

III.3. Resultados y discusión.

III.3.1. Optimización del método de análisis.

III.3.1.1. Optimización de las condiciones de extracción.

Se evaluó el tiempo de extracción, el volumen de muestra, la velocidad de agitación, la dilución de la muestra y el efecto de la fuerza iónica debida a la adición de NaCl, para alcanzar las mejores condiciones analíticas globales. Se seleccionó el número total de picos cromatográficos y el área cromatográfica total obtenida como respuestas experimentales para la optimización.

Exploración por medio de un diseño factorial 2^{5-1} .

El diseño exploratorio inicial servía para detectar aquellas variables que tenían mayor influencia sobre las respuestas experimentales (el número total de picos cromatográficos y el área cromatográfica total obtenida).

Los datos obtenidos de estas respuestas fueron analizados por ANOVA con un nivel de significación del 5%. Los resultados se muestran en un diagrama de barras (figura III.1). En estos gráficos los datos son presentados de forma gráfica con las causas representadas en orden de intensidad.

El tiempo de extracción, la velocidad de agitación, la concentración de NaCl y la dilución fueron parámetros significativos (para $p < 0.05$) tanto para el número de picos cromatográficos como para el área total. El volumen de muestra sólo fue significativo, con un efecto leve, para el área total. El tiempo de extracción fue la variable más influyente, tanto para el número de picos como para el área total. Todos los factores significativos afectaban a ambas respuestas con signo positivo, con la excepción de la dilución de la muestra que, como se esperaba, los afectaba con signo negativo.

La eficacia de la SBSE también se veía afectada por la interrelación entre las variables, como se muestra en la figura III.1. La interacción entre los factores tiempo de extracción y velocidad de agitación aparece como estadísticamente significativo, con signo positivo, tanto para el número de picos detectados como para el área total. Para esta última respuesta experimental, las interacciones entre tiempo de extracción y volumen de muestra y NaCl también fueron significativas.

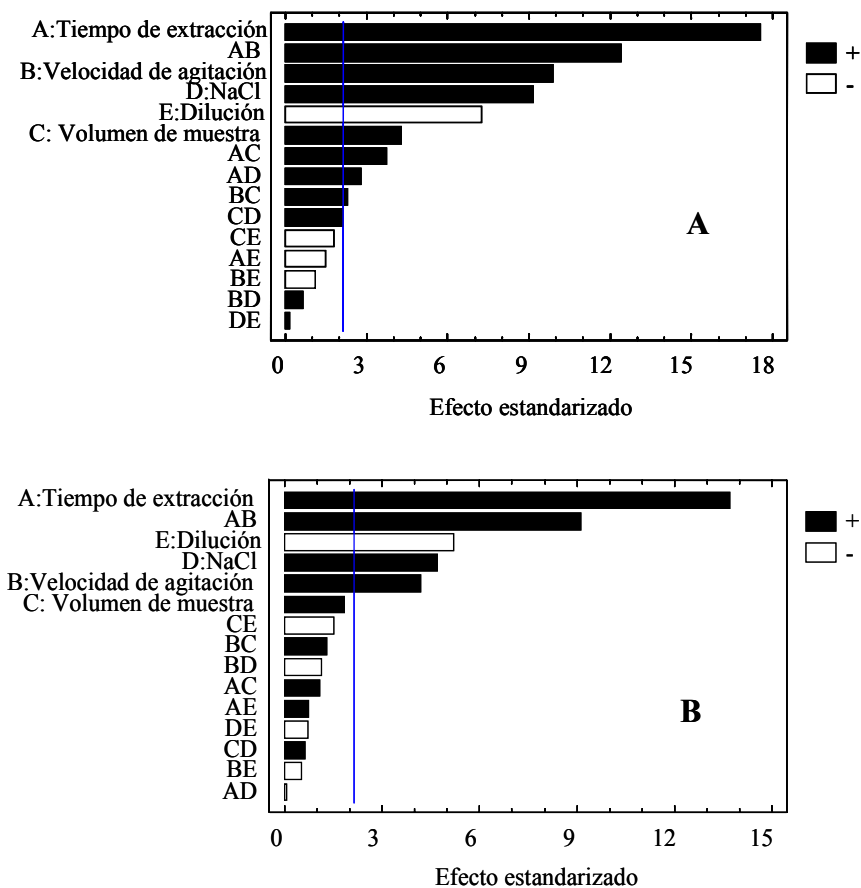


Figura III.1. Diagrama de pareto de los principales efectos en el diseño factorial 2^{5-1} para el área total (A) y el número de picos cromatográficos (B). Optimización de las condiciones de extracción.

Optimización por un diseño central compuesto.

Como se puede apreciar, la técnica SBSE se ve afectada por parámetros interrelacionados. Para un diseño de optimización, es aconsejable mantener el número de parámetros tan pequeño como sea posible para evitar modelos de respuesta muy complejos y una elevada variabilidad. Dado que el volumen de muestra no demostraba ser una influencia estadísticamente

significativa en las respuestas consideradas (el número total de picos cromatográficos y el área cromatográfica total obtenida), se decidió no mantener este factor a la hora de obtener la curvatura de las superficies de respuesta. Para el diseño central compuesto (CCD), los cuatro parámetros utilizados fueron el tiempo de extracción, la velocidad de agitación, la dilución de la muestra y el contenido en NaCl. El volumen de muestra fue establecido en 25 ml. Los valores axiales para estos parámetros fueron localizados en una esfera rodeando el diseño factorial de dos niveles (tabla III.1).

Después del CCD, como se esperaba por los experimentos exploratorios, el tiempo de extracción aparecía como el principal efecto estadísticamente significativo, teniendo una fuerte influencia positiva tanto para el área total como para el número de picos cromatográficos (tabla III.3).

La velocidad de agitación y el NaCl mostraron una influencia positiva y significativa en ambas respuestas experimentales mientras que la dilución de las muestras fue estadísticamente negativa para ellas. En general no se observaron problemas de superposición de picos ni saturación del detector cuando se inyectó la muestra sin dilución.

Para ambas respuestas experimentales, de las interacciones entre dos factores, la interacción entre el tiempo de extracción y la velocidad de agitación fue la más significativa estadísticamente.

La figura III.2 muestra los gráficos de superficie de respuesta para el área total y el número de picos cromatográficos, obtenidos representando el tiempo de extracción frente la velocidad de agitación.

Tabla III.3. Principales efectos e interacciones en el diseño central compuesto Para el número de picos cromatográficos y el área total. Optimización de las condiciones de extracción.

Efecto	Nº de picos cromatográficos		Área total	
	relación F	P valor	relación F	P valor
A: Tiempo de extracción	100.98	0.0000 ^A	48.29	0.0000 ^A
B: Velocidad de agitación	15.36	0.0004 ^A	20.19	0.0001 ^A
C: NaCl	7.46	0.0099 ^A	17.39	0.0002 ^A
D: Dilución	14.44	0.0006 ^A	7.01	0.0122 ^A
AA	30.80	0.0000 ^A	23.08	0.0000 ^A
AB	22.89	0.0000 ^A	15.08	0.0005 ^A
AC	0.37	0.5495	2.26	0.1416
AD	1.07	0.3074	3.53	0.0688
BB	40.02	0.0000 ^A	49.35	0.0000 ^A
BC	1.00	0.3235	0.44	0.5125
BD	1.96	0.1709	0.28	0.5972
CC	0.80	0.3780	0.02	0.8907
CD	4.96	0.0326 ^A	5.45	0.0257 ^A
DD	2.78	0.1044	9.26	0.0045 ^A

Los valores ^A son significativos para $p < 0.05$

Se sabe que una agitación intensiva acorta el tiempo de extracción. Con elevados tiempos de extracción (130 minutos) se obtuvieron mejores respuestas experimentales, del mismo modo que al aumentar la velocidad de agitación. Esta interacción indica que un tiempo de muestreo largo produce la extracción de un mayor número de compuestos volátiles, cuando se usa una velocidad de agitación elevada.

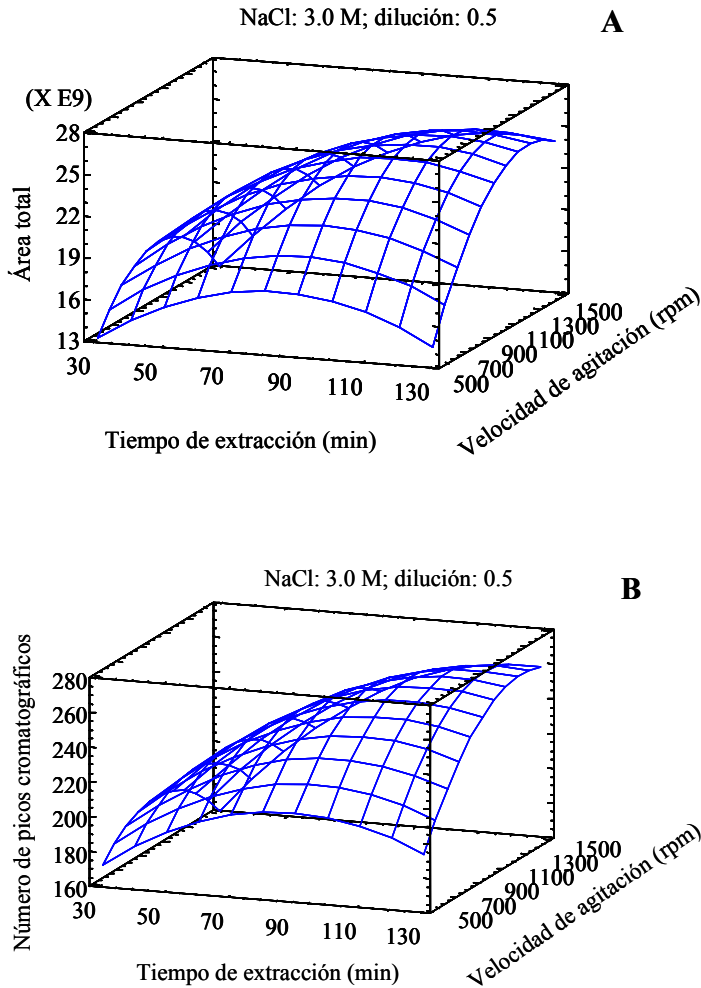


Figura III.2. Superficies de respuesta estimadas para el área cromatográfica total (A) y el número de picos cromatográficos (B) usando el diseño central compuesto obtenidas al representar tiempo de extracción frente a velocidad de agitación. Optimización de las condiciones de extracción.

En resumen, después de la evaluación de los principales factores y sus interacciones, las mejores condiciones para la extracción de compuestos volátiles en el vinagre fueron:

- ✓ Volumen de muestra: 25 ml sin dilución
- ✓ Tiempo de muestreo: 120 min

- ✓ Cantidad de NaCl: 5.85 g
- ✓ Velocidad de agitación: 1250 rpm

III.3.1.2. Optimización de las condiciones de desorción.

Se evaluó el tiempo y la temperatura de desorción, el flujo de helio y la temperatura de crioconcentración para alcanzar las mejores condiciones analíticas globales. Como respuestas experimentales para la optimización se seleccionó el número de picos cromatográficos y el área cromatográfica total obtenida.

Exploración por medio de un diseño factorial 2⁴.

Los datos obtenidos de estos parámetros fueron evaluados por ANOVA con un nivel de significación del 5%.

Los resultados se pueden mostrar con un diagrama de barras (figura III.3)

La temperatura de desorción, con signo positivo, y la temperatura de crioconcentración, con signo negativo, fueron significativas (con $p < 0.05$) para el área total y el número de picos cromatográficos. El flujo de helio sólo fue significativo, con un efecto leve, para el número de picos cromatográficos. El efecto del tiempo de desorción no fue significativo para ambas respuestas experimentales. En este caso, las interacciones entre dos factores no fueron significativas para el área total y tuvieron un efecto muy leve para el número de picos cromatográficos.

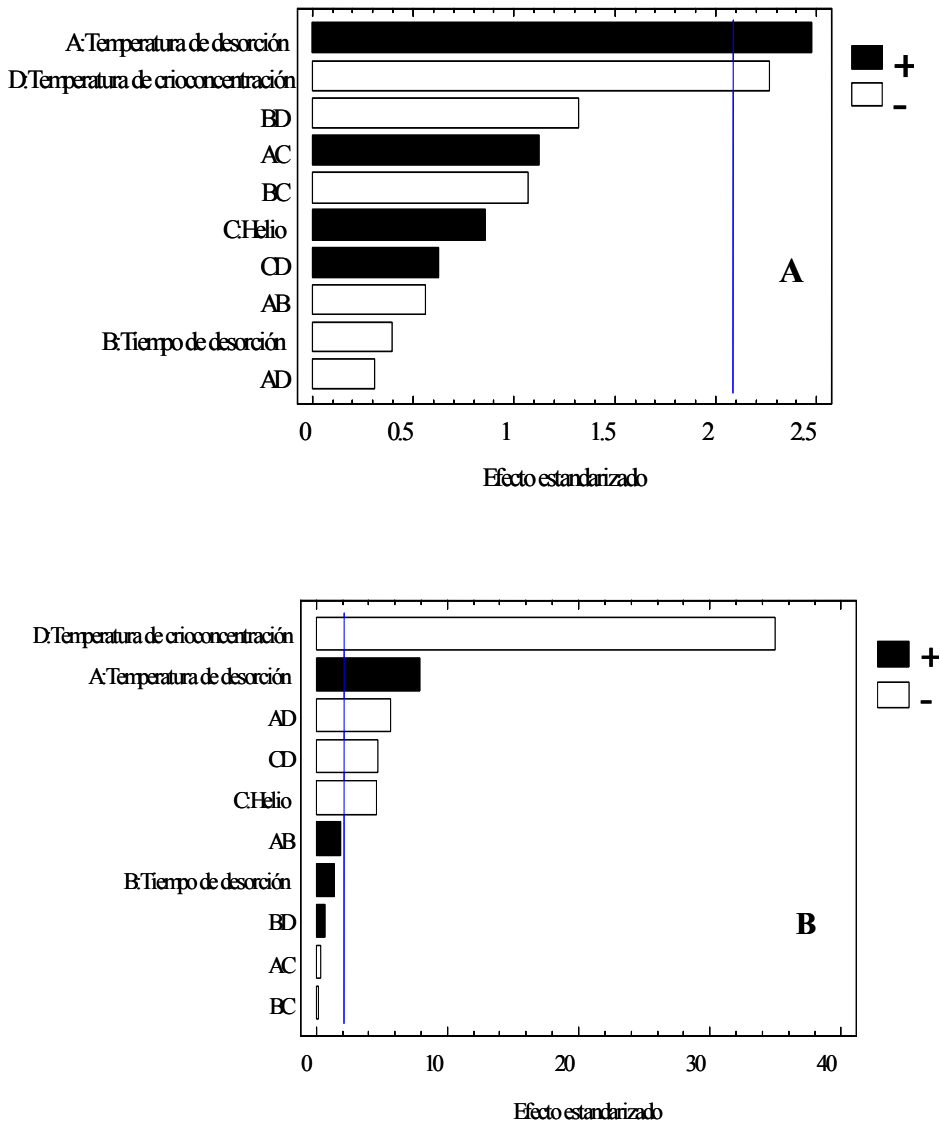


Figura III.3. Diagrama de pareto de los principales efectos en el diseño factorial 2^4 para el área total (A) y el número de picos cromatográficos (B). Optimización de las condiciones de desorción.

Optimización por un diseño central compuesto.

Teniendo en cuenta estos resultados y que es conveniente mantener el número de parámetros tan pequeño como sea posible, se decidió que el

tiempo de desorción y el flujo de helio no se mantendrían para realizar este estudio estadístico. Se fijaron respectivamente en 10 minutos el tiempo de desorción y en 75 ml/min el flujo de helio.

Para el diseño central compuesto (CCD), los dos parámetros que se utilizaron fueron las temperaturas de desorción y de crioconcentración. Los valores axiales para estos parámetros están localizados en una esfera rodeando el diseño factorial de dos niveles (tabla III.2).

Después de realizar el CCD, los dos factores fueron significativos tanto para el área total como para el número de picos, como cabía esperar de los experimentos exploratorios. La interacción entre la temperatura de desorción y la temperatura de crioconcentración sólo fue significativa para el área total.

La figura III.4 muestra el diagrama de superficie de respuesta para el área total, obtenido al representar la temperatura de desorción frente a la temperatura de crioconcentración. A un valor alto de temperatura de desorción (330°C) se obtienen mejores respuestas experimentales, del mismo modo que al disminuir la temperatura de crioconcentración.

Esta interacción indica que una temperatura de crioconcentración baja produce la desorción de un mayor número de compuestos volátiles dentro del cromatógrafo de gases cuando se usa una temperatura de desorción elevada.

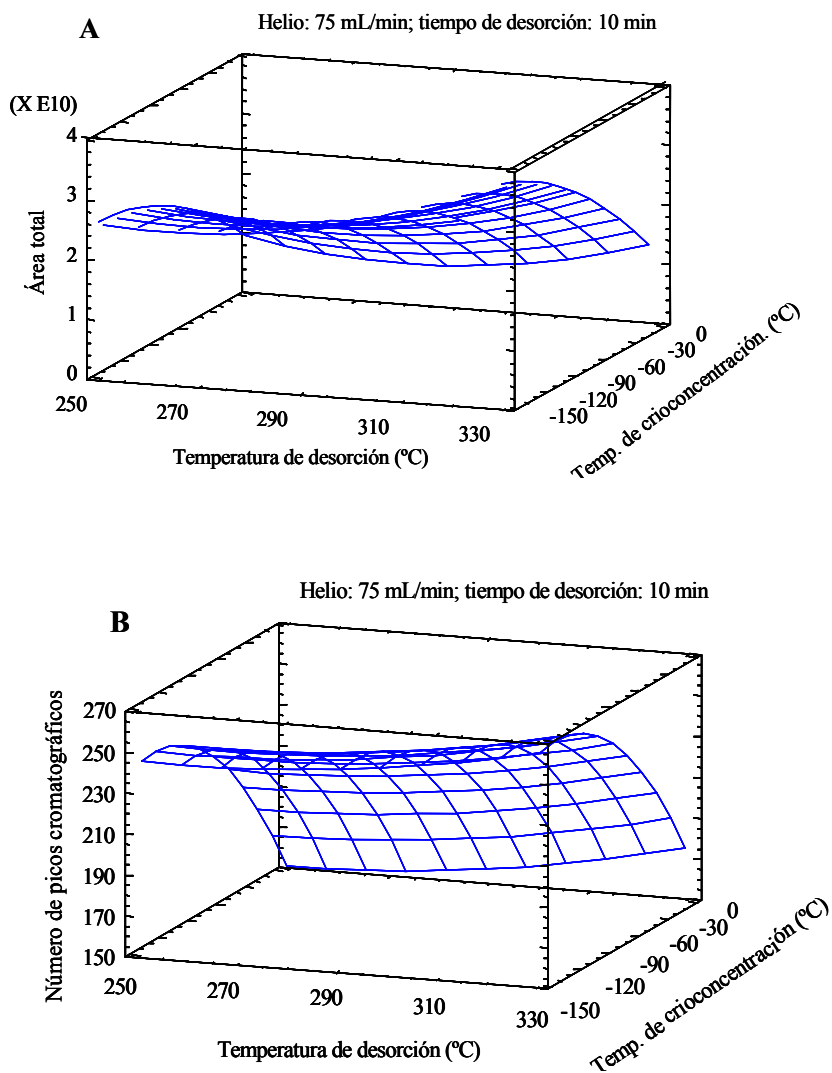


Figura III.4. Superficies de respuesta estimadas para el área cromatográfica total (A) y el número de picos cromatográficos (B) usando el diseño central compuesto obtenidas al representar temperatura de desorción frente a temperatura de crioconcentración. Optimización de las condiciones de desorción.

En resumen, después de la evaluación de los principales factores y de sus interacciones, las condiciones óptimas para la desorción de los compuestos volátiles del vinagre fueron:

- ✓ Temperatura de desorción: 330°C
- ✓ Temperatura de crioconcentración: -140°C
- ✓ Flujo de helio: 75 ml/min
- ✓ Tiempo de desorción: 10 min

Teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante, se eligió finalmente como temperatura de desorción 300°C, para no dañar las barras agitadoras.

III.3.3. Estudio comparativo entre la SPME y la SBSE.

Este método analítico se empleó para analizar diferentes muestras de vinagre de Jerez suministradas por diferentes productores. Cada muestra se analizó por triplicado.

Los cromatogramas obtenidos empleando SPME y SBSE para una de las muestras de vinagre se muestran en las figuras III.5 y III.6.

Como se puede observar, la SBSE exhibe mejores sensibilidades que la SPME para la mayoría de los compuestos volátiles. Sin embargo, algunos de estos compuestos, como el ácido acético, 2,3-butanodiol, decanoato de etilo, 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno y acetato de n-butilo no se pudieron identificar mediante la SBSE. Este hecho se puede explicar en base a la polaridad de la barra agitadora de PDMS, la cual ofrece una capacidad limitada de extracción para volátiles polares.

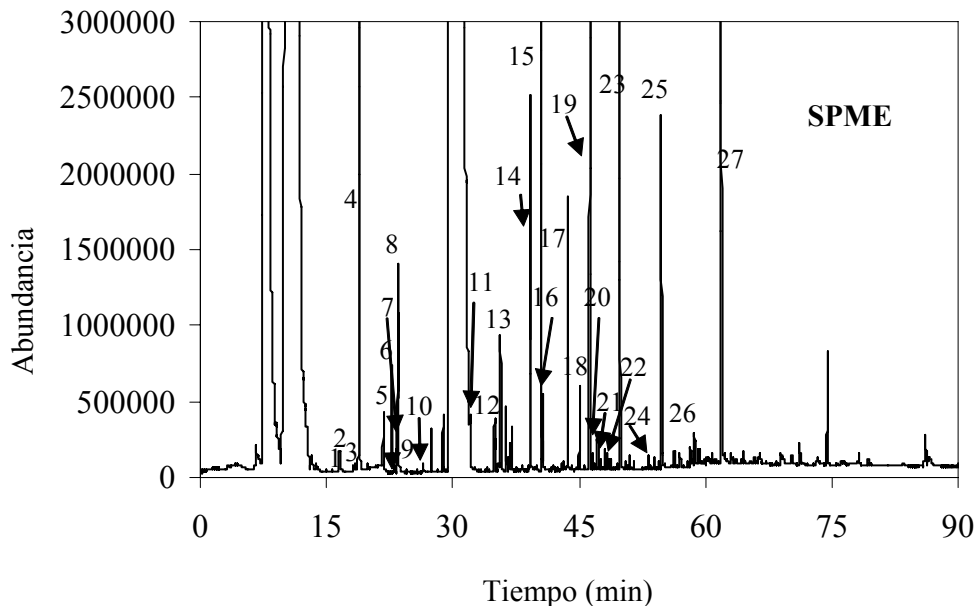


Figura III.5. Cromatograma de una muestra de vinagre, obtenido por SPME.

1, acetato de n-butilo; 2, valeriato de etilo; 3, 2-metil-1-propanol; 4, acetato de isoamilo; 5, 4-metil-2-pentanol (P.I.); 6, caproato de etilo ; 7, 2-metil-1-butanol; 8, alcohol isoamílico; 9, acetato de hexilo; 10, 3-hidroxi-2-butanona; 11, 2-furaldehído; 12, benzaldehído; 13, 2,3-butanodiol; 14, decanoato de etilo; 15, ácido isovalérico; 16, succinato de dietilo; 17, 1,1,6 trimetil-1,2-dihidro-naftaleno; 18, 2-fenilacetato de etilo; 19, acetato de 2-feniletilo; 20, ácido hexanoico; 21, α -ionona; 22, alcohol bencílico; 23, 2-feniletanol; 24, 4-etilguaiacol; 25, ácido octanoico; 26, 4-etilfenol; 27, ácido decanoico.

Algunos volátiles sólo pudieron ser identificados por la SBSE, como por ejemplo isobutirato de etilo, acetato de propilo, octanoato de etilo, decanal, ácido isobutírico, 5-metil-2-furfural, ácido butírico, α -terpineol, acetato de bencilo, eugenol, etc.

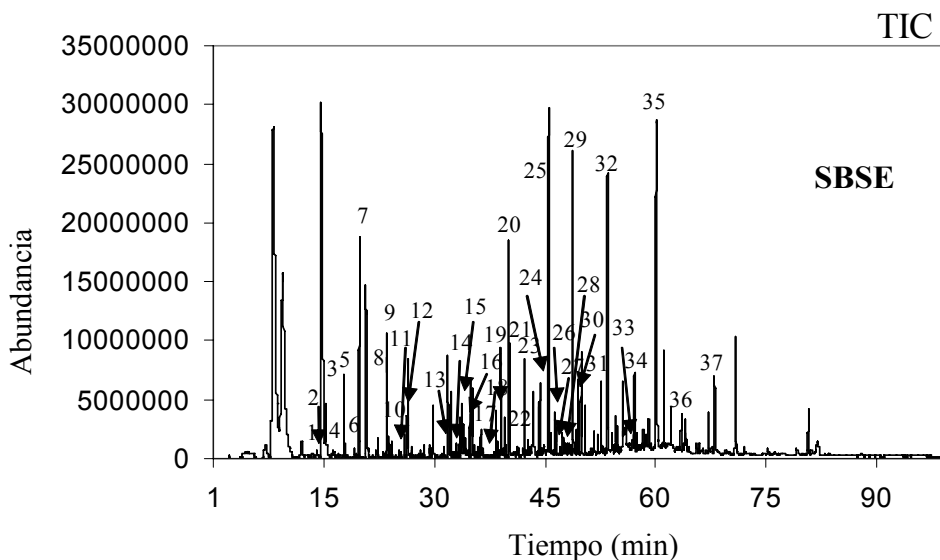


Figura III.6. Cromatograma de una muestra de vinagre obtenido por SBSE. 1, isobutirato de etilo; 2, acetato de propilo; 3, acetato de isobutilo; 4, butirato de etilo; 5, pentanoato de etilo; 6, 2-metil-1-propanol; 7, acetato de isoamilo; 8, 2-metil-1-butanol; 9, alcohol isoamílico; 10, hexanoato de etilo; 11, acetato de hexilo; 12, 3-hidroxi-2-butanona; 13, octanoato de etilo; 14, 2-furaldehído; 15, decanal; 16, benzaldehído; 17, ácido isobutírico; 18, 5-metil-2-furfural; 19, ácido butanoico; 20, ácido isovalérico; 21, succinato de dietilo; 22, α -terpineol; 23, acetato de benzilo; 24, fenilacetato de etilo; 25, acetato de 2-feniletilo; 26, ácido hexanoico; 27, α -ionona; 28, alcohol bencílico; 29, 2-feniletanol, 30, ácido 2-etilhexanoico; 31, 4-etilguaiacol; 32, ácido octanoico; 33, eugenol; 34, 4-etilfenol; 35, ácido decanoico; 36, ftalato de dietilo; 37, ácido laurico.

III.3.4. Características analíticas.

III.3.4.1. Calibración. Linealidad.

Para estimar los límites de detección de algunos compuestos relevantes, se analizaron cinco niveles de concentración por triplicado; estas concentraciones cubrían los rangos de concentración esperados para estos compuestos en vinagres.

La medida que se estudió para cada compuesto fue la del área relativa [compuesto volátil/patrón interno] del pico cromatográfico del ión molecular. El rango de linealidad estudiado para cada compuesto aparece en la tabla III.4. Los coeficientes de correlación fueron buenos ($r^2 > 0.99$).

Tabla III.4. Linealidad, límites de detección y repetibilidad para algunos compuestos volátiles.

Compuesto	Rango lineal (µg/l)	r^2	O.O. ± D.E.	Pendiente ± D.E.	L.O.D. (µg/L)	Repet. (RSD, %)
Isobutirato de etilo	13.13-1093.75	0.9992	0.0248±0.0110	0.0030±0.0000	3.31	5.39
Butirato de etilo	2.35-141.06	0.9956	0.0322±0.0048	0.0035±0.0001	0.71	5.27
Alcohol isoamílico*	0.48-100.00	0.9919	0.0133±0.0042	$2 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	0.22	2.88
3-Hidroxi-2-butanona*	3.38-2706.24	0.9973	0.0436±0.0023	$7 \times 10^{-7} \pm 2 \times 10^{-8}$	2.20	9.49
Hexan-1-ol	22.65-566.25	0.9986	0.0007±0.0017	0.0041±0.0000	8.60	3.45
Hexanoato de etilo	0.15-153.50	0.9983	0.0154±0.0045	0.0083±0.0001	0.05	4.88
Benzaldehído	1.96-196.00	0.9988	0.0061±0.0004	0.0005±0.0000	0.52	4.18
Ácido isobutírico*	2.43-121.26	0.9953	0.0107±0.0179	$1 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	0.89	5.04
5-Metil-2-furaldehído	9.02-2310.00	0.9944	0.0170±0.0042	0.0002±0.0000	4.51	6.41
α-terpineol	0.67-66.84	0.9983	-0.0077±0.0036	0.0109±0.0001	0.35	8.76
Ácido octanoico*	0.06-6.41	0.9990	0.0788±0.0106	0.0004±0.0000	0.03	9.80
Eugenol	1.41-236.60	0.9980	-0.0217±0.0171	0.0145±0.0002	0.35	4.57

* mg/l

III.3.4.2. Límites de detección y repetibilidad.

Los límites de detección se calcularon a partir de las curvas de calibrado construidas para cada compuesto volátil, empleando el programa informático Alamin [21].

Los límites de detección obtenidos (tres veces la desviación estándar relativa del blanco analítico calculado a partir de la curva de calibrado) (tabla III.4), son lo suficientemente bajos para determinar estos compuestos en muestras reales de vinagres, teniendo en cuenta la concentración encontrada para ellos en la bibliografía [22,23].

La repetibilidad se evaluó a partir de una serie de cinco extracciones de un vinagre de vino de Jerez comercial. Se calcularon las concentraciones medias para los compuestos volátiles estudiados junto con sus desviaciones estándares relativas (RSD) (tabla III.4). Los valores de RSD obtenidos oscilaron entre el 2.88-9.80%. Estos resultados corroboran la alta reproductibilidad de esta técnica.

III.4. Conclusiones.

Las condiciones para el análisis de compuestos volátiles en vinagres empleando SBSE-TD-GC-MS se han optimizado empleando herramientas estadísticas. Los límites de detección y la repetibilidad obtenida para los compuestos volátiles estudiados son adecuados para su cuantificación en vinagre.

Este método puede ser considerado como una alternativa a otros métodos de análisis como la SPME. Es una técnica muy simple, libre de disolventes y rápida, con mejores sensibilidades, en general, que la SPME.

La SPME presenta varias ventajas con respecto a la SBSE, en particular porque, hasta la fecha, la barra agitadora ofrece una capacidad de enriquecimiento limitada para compuestos volátiles, puesto que solamente están disponibles comercialmente recubrimientos de PDMS.

III.5. Bibliografía.

- [1] Rapp, H. Hastrich, L. Engel, *Vitis* 15 (1976) 29.
- [2] G. Edwards, R. B. Beelman, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 216.
- [3] C. Noble, R.A. Flath, R.R. Forrey, *J. Agric Food Chem.* 28 (1980) 346.
- [4] R. Castro, R. Natera; M.V.G. Moreno; C.G. Barroso, *J. of Chromatogr. A* 953 (2002) 7.
- [5] R. Natera; R. Castro; M.V. García-Moreno; C.G. Barroso; F. García Rowe, *J. of Chromatogr. A* 967 (2002) 261.
- [6] J.L. Wang, W.L. Chen, *J. of Chromatogr. A* 927 (2001) 143.
- [7] G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1251.
- [8] G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, J. Tabera, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 11.
- [9] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [10] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo; S. Muñoz, I. Valor, *J. of Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [11] M.S. Garcia-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Water Research* 38 (2004) 1679.
- [12] S. Nakamura, S. Daishima, *J. of Chromatogr. A* 1038 (2004) 291.
- [13] J. Pawliszyn. "Solid phase microextraction-theory and practice". Wiley, New York, 1997.

- [14] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 961.
- [15] Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *J. of Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- [16] E. Morgan, “*Chemometrics: Experimental Design*”, Wiley, Chichester, 1991, pág: 197.
- [17] R.G. Brereton, “*Chemometric: Applications of mathematics and Statistics to Laboratory Systems*”, Ellis Horwood, Chichester, 1990.
- [18] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 293.
- [19] C. Fisher, U. Fisher, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1995.
- [20] R.S. Whiton, B.W. Zoecklein, *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (2000) 379.
- [21] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J.L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [22] V. Gerbi, G. Zeppa, A. Carnacini, *J. Food Sci.* 4 (1992) 259.
- [23] G. Blanch, J. Tabera, J. Sanz, M. Herraiz, G. Roglero, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1046.

IV VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINAGRES MEDIANTE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR ABSORCIÓN EN BARRA AGITADORA (SBSE) Y COMPARACIÓN CON LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME).

IV. Introducción.

En el capítulo anterior, se llevó a cabo la optimización de un procedimiento de extracción y desorción térmica de compuestos volátiles en vinagres mediante SBSE, acoplado a cromatografía gaseosa capilar con determinación mediante espectrometría de masas [1]. Esta técnica se ha aplicado con anterioridad a diferentes matrices, obteniéndose muy buenos resultados [2-11]

El objetivo de este capítulo es realizar la validación del método optimizado previamente, así como compararlo con una metodología previa basada en la técnica SPME [12]. Después de la validación, el método se aplicó a diferentes muestras de vinagres comerciales.

IV.2. Experimental.

IV.2.1. Muestras de vinagre.

Se empleó una muestra de vinagre de Jerez comercial para validar el método analítico previamente optimizado. Después de la validación, se analizaron diferentes muestras de vinagres procedentes de diferentes materias primas. El estudio comparativo con la SPME se llevó a cabo empleando diferentes muestras de vinagre comerciales.

IV.2.2. Reactivos.

Todos los patrones de los compuestos volátiles empleados en el estudio fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania) y Sigma (Steinheim, Alemania).

Se prepararon disoluciones individuales de cada compuesto aromático, pesando y enrasando con etanol. Se preparó en vinagre sintético (2g/l de ácido tartárico, 80 g/l de ácido acético, 1 g/l de acetato de etilo y 10 ml/l de etanol, en agua Milli-Q) una disolución global patrón de todos los compuestos. Las disoluciones de trabajo que se emplearon para determinar las características analíticas de la metodología de SBSE, se prepararon mediante dilución de diferentes cantidades de la disolución patrón en una disolución de vinagre sintético. Todas las disoluciones empleadas se almacenaron a 4 °C. El 4-metil-2-pentanol se empleó como patrón interno. El cloruro sódico fue suministrado por Scharlau (Barcelona).

IV.2.3. SPME.

IV.2.3.1. Preparación de muestra.

Para cada análisis de SPME, se pipeteó un volumen de 15 ml de vinagre y se depositó en un vial de vidrio de 50 ml con 6.14 gramos de cloruro sódico. A cada muestra se le añadieron 50 µl de una disolución de 4-metil-2-pentanol (2.27 g/l en agua Milli-Q conteniendo 80 g/l de ácido acético). También se añadía una barra agitadora magnética pequeña. El vial era encapsulado fuertemente con un septum de silicona con recubrimiento de PTFE. El vial se depositaba en un baño termostatzado con agitación. La muestra se atemperaba durante cinco minutos a la temperatura de extracción y, después de esto, la fibra de SPME (carboxen-polidimetilsiloxano, CAR-

PDMS 75 μm) se insertaba en el espacio de cabeza. Durante el tiempo de extracción, la muestra se agitaba a velocidad constante. Una vez finalizada la extracción, la fibra se retiraba del vial y se insertaba en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases.

IV.2.3.2. Condiciones cromatográficas.

Las muestras se analizaron empleando un cromatógrafo de gases GC 8000 con un detector FID (Fisons Instruments, Milan, Italia).

La inyección realizó en modo splitless durante 2 minutos. Para la desorción de los analitos dentro del puerto de inyección del cromatógrafo de gases, la temperatura se fijó a 280°C. El GC estaba equipado con una columna capilar DB.Wax (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 60 m x 0.25 mm D.I., con un recubrimiento de 0.25 μm . Se empleó helio como gas portador, a un flujo de 1.1 ml/min. La temperatura del detector fue de 250°C. El horno se programó como se explica a continuación: 35°C durante 10 minutos, luego una rampa de 5°C/min hasta los 100°C; posteriormente se alcanzaron los 210°C a una velocidad de 3°C/min y se mantuvieron durante 40 minutos.

Los compuestos se identificaron mediante análisis con espectrometría de masas. En estos análisis se empleó el mismo cromatógrafo de gases, bajo las mismas condiciones analíticas mencionadas antes, acoplado a un detector de masas MD 800 (Fisons Instruments, Milan, Italia). El detector de masas operó en modo EI + a 70 eV en un rango de 30 a 450 uma.

La señal se procesó con el software Masslab y con la biblioteca Wiley 6.0. La identificación de los picos se llevó a cabo mediante analogía

con los espectros de masas y se confirmaron con los tiempos de retención de los patrones cuando éstos estaban disponibles, o mediante el tiempo de retención de la bibliografía. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron mediante el cálculo del área relativa del pico en relación al área del patrón interno, 4-metil-2-pentanol.

IV.2.4. SBSE.

IV.2.4.1. Preparación de muestra.

Las extracciones se llevaron a cabo empleando las condiciones analíticas obtenidas de la optimización realizada en el capítulo anterior.

IV.2.4.2. Instrumental.

Las condiciones instrumentales empleadas fueron las mismas que las empleadas en el capítulo anterior para la optimización del método de análisis.

IV.3. Resultados y discusión.

Empleando la técnica SBSE en las muestras estudiadas se detectaron un mayor número de compuestos volátiles. Por SBSE, pudieron ser identificados un total de 47 compuestos volátiles, mientras que por SPME, solamente se encontraron 25. La mayoría de los compuestos encontrados por SBSE y no por SPME son compuestos furánicos.

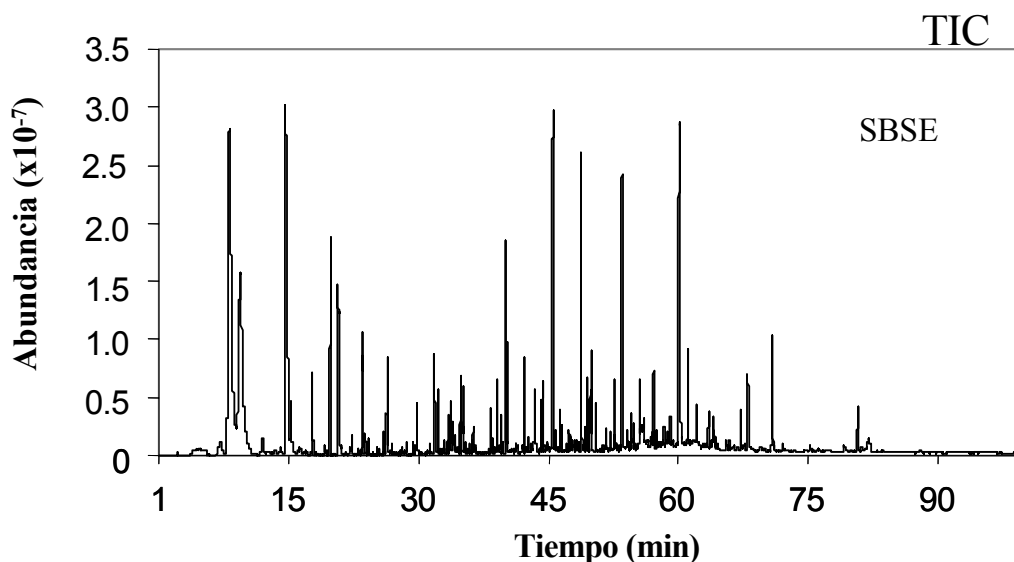


Figura IV.1. Cromatograma de una muestra de vinagre, obtenido por SBSE. Tiempos de retención (min): isobutirato de etilo (13.62); acetato de propilo (13.99); acetato de isobutilo (15.76); butirato de etilo (16.84); acetato de n-butilo (18.38); isovalerato de etilo (18.46); hexanal (18.70); isobutanol (19.71); acetato de isoamilo (20.57); valerato de etilo (20.77); 1-butanol (21.84); trans-2-hexenal (24.01); alcohol isoamílico (23.84); 2-metil-1-butanol (24.12); caproato de etilo (24.65); acetato de hexilo (25.80); 3-hidroxi-2-butanona (26.62); acetato de cis-3-hexen-1-ol (27.59); lactato de etilo (28.51); hexan-1-ol (28.87); cis-3-hexen-1-ol (30.04); trans-2-hexen-1-ol (30.82); octanoato de etilo (31.87); 2-furaldehído (32.87); benzaldehído (35.15); ácido isobutírico (36.84); 5-metil-2-furaldehído (36.95); 2-acetil-5-metilfurano (38.54); ácido butírico (38.89); ácido isovalérico (40.28); succinato de dietilo (40.58); α -terpineol (41.51); acetato de bencilo (42.64); 2-fenilacetato de etilo (44.59); acetato de 2-feniletilo (45.95); ácido hexanoico (46.57); alcohol bencílico (47.03); 2-feniletanol (49.21); ácido 2-etilhexanoico (50.17); 4-etilguaiacol (52.87); ácido octanoico (53.75); eugenol (57.21); 4-etilfenol (57.36); 5-acetoximetil-2-furaldehído (58.00); ácido decanoico (60.39); ftalato de dietilo (63.87); 5-hidroximetil-2-furaldehído (68.90).

IV.3.1. Características analíticas.

En el capítulo anterior, se construyeron las curvas de calibrado para un reducido número de compuestos relevantes con el fin de estimar los límites de detección y la repetibilidad de cada uno. En este capítulo, el

número de compuestos estudiados se ha extendido hasta 47 y se ha llevado a cabo un estudio completo de validación, estudiando la calibración y linealidad, los límites de detección y cuantificación, la recuperación, la repetibilidad y reproducibilidad, y el posible efecto matriz del contenido de ácido acético. La figura IV.1 muestra un cromatograma típico de un vinagre de vino de Jerez obtenido a partir de SBSE.

IV.3.1.1. Calibración. Linealidad.

Se midieron cinco niveles de concentración por triplicado. Esas concentraciones cubrían los rangos esperados para los diferentes compuestos aromáticos de los vinagres. La medida que se estudió para cada compuesto fue la del área relativa [compuesto volátil/patrón interno] del pico cromatográfico del ión molecular. El rango de linealidad estudiado para cada compuesto aparece en la tabla IV.1. Los coeficientes de correlación fueron buenos ($r^2 > 0.99$).

Se obtuvo una excelente linealidad para todos los casos en el rango estudiado. Esto se corroboró también con la “linealidad on-line (LOL)”, con valores superiores al 97% (tabla IV.1). Este parámetro se determina usando la siguiente ecuación, en donde el valor RSD(b) es la desviación relativa de la pendiente (expresada en forma de porcentaje).

$$\text{LOL (\%)} = 100 - \text{RSD(b)}$$

Unos resultados similares a éstos se obtuvieron también por SPME, con valores de LOL mayores del 97% [12].

Tabla IV.1. Características de las curvas de calibrado.

Compuesto	Rango lineal ($\mu\text{g/l}$)	r^2	Linealidad (LOL, %)	Pendiente \pm D.E.	Ord. Orig. \pm D.E.
Isobutirato de etilo	13.13-1093.75	0.9992	99.20	0.0030 \pm 0.0000	0.0248 \pm 0.0110
Acetato de propilo	3.11-777.75	0.9957	98.25	0.0003 \pm 0.0000	0.0064 \pm 0.0018
Acetato de isobutilo	29.69-2226.75	0.9900	98.47	0.0035 \pm 0.0001	0.2970 \pm 0.0862
Butirato de etilo	2.35-141.06	0.9956	97.91	0.0035 \pm 0.0001	0.0322 \pm 0.0048
Isovalerato de etilo	2.42-727.65	0.9990	99.02	0.0061 \pm 0.0001	0.4369 \pm 0.0191
Acetato de n-butilo	8.62-862.00	0.9979	98.55	0.0008 \pm 0.0000	0.0642 \pm 0.0043
Hexanal	37.82-945.50	0.9953	97.56	0.0009 \pm 0.0000	0.0620 \pm 0.0107
Isobutanol*	0.47-35.09	0.9958	97.94	5 $\times 10^{-6}$ \pm 1 $\times 10^{-7}$	-0.0025 \pm 0.0016
Acetato de isopentilo	106.61-3345	0.9980	97.27	0.0009 \pm 0.0000	0.5393 \pm 0.0417
Valerato de etilo	0.109-10.90	0.9956	98.07	0.0030 \pm 0.0001	0.0013 \pm 0.0003
1-Butanol	22.50-305.91	0.9994	98.76	0.0010 \pm 0.0000	-0.0161 \pm 0.0027
trans-2-Hexenal	47.19-1179.75	0.9975	98.83	0.0003 \pm 0.0000	0.031 \pm 0.003
2-Metil-1-butanol*	1.42-142.20	0.9876	97.51	1 $\times 10^{-5}$ \pm 1 $\times 10^{-6}$	0.1203 \pm 0.0331
Alcohol isoamílico*	0.48-100.00	0.9919	97.81	2 $\times 10^{-5}$ \pm 2 $\times 10^{-6}$	0.0133 \pm 0.0042
3-Hidroxi-2-butanona*	3.38-2706.24	0.9973	98.71	7 $\times 10^{-7}$ \pm 2 $\times 10^{-8}$	0.0436 \pm 0.0023
Caproato de etilo	0.15-153.50	0.9983	99.02	0.0083 \pm 0.0001	0.0154 \pm 0.0045
Acetato de hexilo	0.12-35.31	0.9976	98.67	0.0486 \pm 0.0006	0.0366 \pm 0.0086
Acetato de <i>cis</i> 3-hexen-1-ol	0.36-108.15	0.9989	99.16	0.0290 \pm 0.0003	0.1362 \pm 0.0106
Lactato de etilo*	0.13-33.71	0.9941	97.94	2 $\times 10^{-5}$ \pm 3 $\times 10^{-6}$	0.0166 \pm 0.0049
Hexan-1-ol	22.65-566.25	0.9986	99.47	0.0041 \pm 0.0000	0.0007 \pm 0.0017
<i>cis</i> 3-Hexen-1-ol	16.29-1221.75	0.9987	98.86	0.0003 \pm 0.0000	0.0009 \pm 0.0020
<i>trans</i> 2-Hexen-1-ol	46.50-2823.75	0.9961	98.23	0.0005 \pm 0.0000	0.5294 \pm 0.0100
Octanoato de etilo	0.11-380.75	0.9994	99.22	0.0607 \pm 0.0034	0.0862 \pm 0.0092
2-Furaldehído*	1.03-15.25	0.9990	98.99	3 $\times 10^{-5}$ \pm 2 $\times 10^{-7}$	0.0101 \pm 0.0005
Benzaldehído	1.96-196.00	0.9988	98.91	0.0005 \pm 0.0000	0.0061 \pm 0.0004
Ácido isobutírico*	2.43-121.26	0.9953	97.82	1 $\times 10^{-5}$ \pm 2 $\times 10^{-6}$	0.0107 \pm 0.0179
5-Metil-2-Furaldehído	9.02-2310.00	0.9944	97.99	0.0002 \pm 0.0000	0.0170 \pm 0.0042

* mg/l

Tabla IV.1 (continuación). Características de las curvas de calibrado

Compuesto	Rango lineal ($\mu\text{g/l}$)	r^2	Linealidad (LOL, %)	Pendiente \pm D.E.	Ord. Orig. \pm D.E.
2-Acetil-5-Metilfurano	1.46-1216.50	0.9978	98.75	0.0011 \pm 0.0000	0.0087 \pm 0.0067
Ácido butírico*	1.92-47.88	0.9963	97.86	2 \times 10 ⁻⁵ \pm 1 \times 10 ⁻⁶	-0.0238 \pm 0.0110
Ácido isovalérico*	2.84-283.74	0.9944	97.62	8 \times 10 ⁻⁶ \pm 1 \times 10 ⁻⁷	0.2888 \pm 0.0225
Succinato de dietilo*	0.05-1.11	0.9953	97.56	0.0009 \pm 0.0000	0.0169 \pm 0.0118
α -terpineol	0.67-66.84	0.9983	98.79	0.0109 \pm 0.0001	-0.0077 \pm 0.0036
Acetato de bencilo	0.75-751.00	0.9932	97.38	0.0020 \pm 0.0001	0.1021 \pm 0.0164
2-Fenilacetato de etilo	4.78-47.80	0.9953	97.20	0.0207 \pm 0.0006	0.0473 \pm 0.0159
Acetato de 2-feniletilo*	0.14-4.70	0.9952	97.53	0.0024 \pm 0.0001	1.7399 \pm 0.1301
Ácido hexanoico*	0.12-2.72	0.9967	97.98	0.0001 \pm 0.0000	0.0045 \pm 0.0025
Alcohol bencílico	25.18-5812.00	0.9980	98.79	2 \times 10 ⁻⁵ \pm 1 \times 10 ⁻⁶	0.0014 \pm 0.0006
2-Feniletanol*	2.13-21.28	0.9967	97.97	0.0001 \pm 0.0000	0.1483 \pm 0.0239
Ácido 2-etilhexanoico	11.63-387.50	0.9960	97.79	0.0096 \pm 0.0002	0.1198 \pm 0.0321
4-Etilguaiaicol	7.15-206.50	0.9961	97.80	0.0202 \pm 0.0004	-0.0033 \pm 0.0079
Ácido octanoico*	0.06-6.41	0.9990	98.98	0.0004 \pm 0.0000	0.0788 \pm 0.0106
Eugenol	1.41-236.60	0.9980	98.81	0.0145 \pm 0.0002	-0.0217 \pm 0.0171
4-Etilfenol	14.60-321.20	0.9956	97.65	0.0014 \pm 0.0000	0.0041 \pm 0.0052
5-Acetoximetil-2-furaldehído	28.17-704.25	0.9968	97.99	0.0001 \pm 0.0000	0.0003 \pm 0.0001
Ácido decanoico	6.73-1682.50	0.9966	97.94	0.0021 \pm 0.0000	0.1282 \pm 0.0347
Ftalato de dietilo	1.12-37.21	0.9983	98.53	0.0934 \pm 0.0013	0.0536 \pm 0.0136
5-Hidroximetil-2-furaldehído*	2.30-325.8	0.9972	98.46	5 \times 10 ⁻⁷ \pm 2 \times 10 ⁻⁸	0.0023 \pm 0.0001

* mg/l

IV.3.1.2. Límites de detección, límites de cuantificación y recuperación.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las curvas de calibrado construidas para cada compuesto, usando el programa informático Alamin [13].

Los límites de detección (tres veces la desviación estándar relativa de los valores analíticos del blanco calculados a partir de las curvas de calibrado) y de cuantificación (diez veces la desviación estándar relativa de los valores analíticos del blanco calculados a partir de las curvas de calibrado) obtenidos (tabla IV.2) son lo suficientemente bajos para determinar esos compuestos en muestras reales de vinagre, teniendo en cuenta las concentraciones encontradas en las muestras estudiadas. Para la SPME [12], los límites de detección y cuantificación que se obtuvieron eran mayores que los obtenidos por SBSE. De hecho, algunos autores ya habían establecido que la SBSE mostraba un gran potencial con límites de detección muy bajos [1, 2].

Para comprobar la exactitud de este método analítico, se usó la técnica de las adiciones estándar. Se tomó una muestra representativa de vinagre como matriz y se añadieron cantidades conocidas de una disolución stock en cinco niveles de concentración y por triplicado. Se compararon las pendientes de las rectas de cada compuesto aromático, obtenidas de este modo, con aquellas que se obtuvieron a partir de la calibración con patrones (criterio t). En general, no se encontraron diferencias significativas entre ellas, usando un nivel de significación del 5%.

La tabla IV.2 nos proporciona también los datos para la recuperación de cada compuesto, determinada mediante la pendiente de la recta obtenida al representar las concentraciones encontradas frente a las concentraciones esperadas.

Tabla IV.2. Características analíticas.

Compuesto	Límite de detección (LOD, µg/l)	Límite de cuantificación (LOQ, µg/l)	Recuperación (%)	Repet. (RSD, %)	Reproduc. (RSD, %)
Isobutirato de etilo	3.31	10.98	99.61	5.39	5.43
Acetato de propilo	0.43	1.41	99.16	4.13	4.43
Acetato de isobutilo	10.01	32.32	99.13	4.85	3.73
Butirato de etilo	0.71	2.35	99.52	5.27	3.92
Isovaleriato de etilo	0.78	2.54	99.12	10.85	9.97
Acetato de n-butilo	2.25	7.34	99.14	9.43	6.97
Hexanal	20.00	65.44	98.82	-	-
Isobutanol	150.22	500.12	85.01	2.97	3.42
Acetato de isopentilo	33.00	110.23	98.44	4.68	9.17
Valeriato de etilo	0.09	0.29	99.03	-	-
1-Butanol	4.13	13.09	99.23	-	-
trans-2-Hexenal	30.12	100.10	98.83	-	-
2-Metil-1-butanol	1000.22	3328.07	99.43	12.90	10.62
Alcohol isoamílico	220.11	733.7	92.16	2.88	3.27
3-Hidroxi-2- butanona	2200.33	7332.66	99.26	9.49	7.46
Caproato de etilo	0.05	0.15	99.79	4.88	11.66
Acetato de hexilo	0.05	0.15	99.11	11.47	11.78
Acetato de <i>cis</i> 3- hexen-1-ol	0.10	0.31	99.08	-	-
Lactato de etilo	50.01	165.23	99.82	-	-
Hexan-1-ol	8.60	27.67	98.91	-	-
<i>cis</i> 3-Hexen-1-ol	7.83	25.70	99.03	-	-
<i>trans</i> 2-Hexen-1-ol	20.01	66.60	80.00	-	-
Octanoato de etilo	0.04	0.13	99.15	24.58	37.6
2-Furaldehído	0.5	1.65	99.04	5.53	4.06
Benzaldehído	0.52	1.52	99.36	4.18	3.79
Ácido isobutírico	888.00	2878.32	98.64	5.04	7.06
5-Metil-2- Furaldehído	4.51	14.99	98.65	6.41	4.25

Tabla IV.2 (continuación). Características analíticas.

Compuesto	Límite de detección (LOD, µg/l)	Límite de cuantificación (LOQ, µg/l)	Recuperación (%)	Repet. (RSD, %)	Reproduc. (RSD, %)
2-Acetil-5-metilfurano	0.34	1.12	99.71	-	-
Ácido butírico	783.11	2609.77	99.2	9.70	11.95
Ácido isovalérico	800.04	2660.87	98.97	4.98	6.32
Succinato de dietilo	34.12	113.54	99.76	4.51	3.42
α-terpineol	0.35	1.15	99.35	8.76	6.86
Acetato de bencilo	0.22	0.73	99.57	5.28	5.08
2-Fenilacetato de etilo	43.99	145.45	99.08	9.12	6.39
Acetato de 2-feniletilo	1.13	3.66	99.30	3.13	4.01
Ácido hexanoico	50.00	165.12	99.40	4.55	10.84
Alcohol bencílico	10.01	31.21	99.16	3.24	2.91
2-Feniletanol	641.07	2136.50	99.07	4.95	3.97
Ácido 2-etilhexanoico	5.00	15.99	99.30	8.69	8.03
4-Etilguaiaicol	2.22	7.30	99.43	3.43	2.85
Ácido octanoico	32.11	106.99	99.00	9.80	10.73
Eugenol	0.35	1.15	98.79	4.57	3.61
4-Etilfenol	5.12	16.12	98.16	7.21	6.13
5-Acetoximetil-2-furaldehído	10.01	33.12	99.23	-	-
Ácido decanoico	2.12	7.01	98.82	4.90	4.37
Ftalato de dietilo	0.47	1.54	98.58	9.62	6.87
5-Hidroximetil-2-furaldehído	100.00	332.32	99.59	9.95	10.78

Se obtuvieron buenos valores de recuperación. Sólo el isobutanol y el *trans* 2 -hexen-1-ol presentaron valores de recuperación menores, 85,01% y 80%, respectivamente.

Para la SPME [12], se obtuvieron buenos valores de precisión con la excepción del 2,3-butanodiol y de la 3-hidroxi-2-butanona, con el 60% y 57%, respectivamente.

IV.3.1.3. Repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad y la reproducibilidad se evaluaron por medio de una serie de cinco extracciones de un vinagre de Jerez comercial usando dos twisters diferentes.

Se calculó la concentración media con su desviación estándar relativa para todos los compuestos volátiles identificados (tabla IV.2). Las desviaciones estándares relativas para cada twister oscilaban entre el 2,88% y el 11,47%. La precisión inter-twister mostraba los mismos rangos de valores de desviación estándar relativa que la precisión intra-twister (2,85-11,95%). Sólo el octanoato de etilo mostró valores de desviación estándar relativa inter e intra-twister mayores. Para la SPME [12], se obtuvieron valores mayores de precisión inter-fibra (2.5-20%) e intra-fibra (4.6-46%), con considerables diferencias observadas entre las respuestas cromatográficas obtenidas para cada fibra y compuesto volátil.

Estos resultados corroboran la elevada reproducibilidad de la SBSE.

IV.3.1.4. Efecto matriz.

Dado que el ácido acético es uno de los principales componentes del vinagre, y que exhibe una elevada volatilidad, puede competir con los diferentes compuestos volátiles en la extracción.

En un estudio previo [12] se demuestra que el contenido en ácido acético influía en la eficacia de la extracción en la técnica SPME. Por lo tanto, para poder comprobar esta posible fuente de interferencia, se añadieron las mismas cantidades de compuestos volátiles (alcoholes, aldehídos, ésteres y ácidos) a cinco muestras de vinagre sintético con diferentes cantidades de ácido acético (0-90 g/l). Se analizaron tres extracciones para cada una de estas muestras de vinagre sintético. Los datos obtenidos muestran que a mayor concentración de ácido acético, menor es la eficacia de la extracción (tabla IV.3).

Tabla IV.3. Áreas absolutas obtenidas para las muestras de vinagre sintético con diferentes concentraciones de ácido acético. Valores medios de las áreas relativas (área del pico/área del patrón interno) con sus desviaciones estándares relativas (en %).

Compuestos volátiles	Concentración de ácido acético (g/l)						Media	RSD
	0	25	50	75	90			
α -Terpineol	1804358	1529598	1238173	1079268	969431	0.031	3.64	
4-Etilguaiaicol	39756464	31766607	23525506	19966430	16620402	0.611	11.39	
Eugenol	8446436	6495912	4736165	4039917	3296366	0.125	13.51	
Alcohol isoamílico	42026208	35079833	28844787	23984035	21340555	0.171	4.44	
Hexanal	26171923	20986423	16532766	14303393	12409147	0.423	6.11	
Benzaldehído	14029612	10676417	7767289	6441205	5692878	0.049	13.37	
Acetato de hexilo	38832140	33770184	28966242	24382615	20950431	0.695	4.22	
Succinato de dietilo	17400568	14850519	11941887	10282973	9151326	0.072	4.63	
Ácido hexanoico	52152707	45303339	45243966	43463383	37545777	0.261	14.53	
Ácido octanoico	123440621	112139695	108355448	92517976	76054304	0.590	9.74	

Aunque las áreas absolutas disminuyen, la relación área del compuesto/área del patrón interno permanece constante (figura IV.2), y las desviaciones estándares relativas son menores del 15%. En general, para el

análisis cuantitativo se puede usar el patrón interno, por lo que la concentración de ácido acético no influye en los datos analíticos.

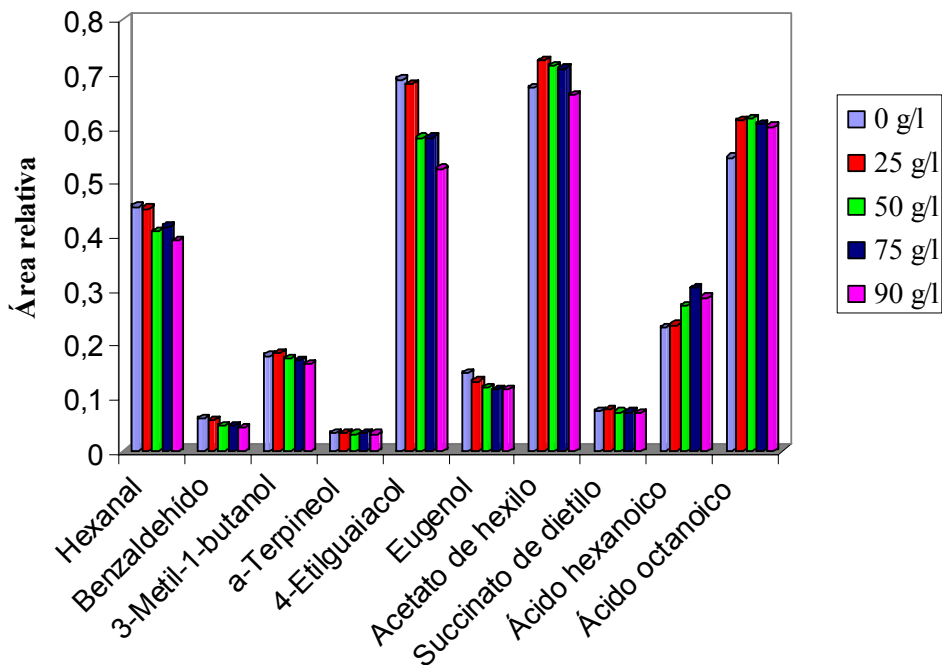


Figura IV.2. Área relativa de los diferentes compuestos volátiles estudiados para las muestras de vinagre sintético con diferentes concentraciones de ácido acético.

IV.3.2. Determinación de compuestos volátiles en vinagres.

El método analítico puesto a punto se usó para analizar una serie de muestras de vinagres de Jerez suministradas por varios productores. Cada muestra se analizó por triplicado.

La media de los resultados obtenidos para algunas de las muestras de vinagre se muestra en la tabla IV.4. Los principales compuestos volátiles cuantificados en estas muestras fueron el isobutanol, 2-metil-1-butanol, 3-

metil-1-butanol, 2-furaldehído, 3-hidroxi-2-butanona, ácido isovalérico, 2-feniletanol, 5-hidroximetil-2-furaldehído.

Entre los ésteres identificados, que resultan de la fermentación de los alcoholes, o por la reacción de los ácidos con alcoholes durante el envejecimiento, los principales compuestos fueron el succinato de dietilo, acetato de 2-feniletilo, acetato de isopentilo y acetato de isobutilo.

Se han encontrado el 2 y el 3-metil-1-butanol en otros vinagres de vino en un rango de 10-100 mg/l [14]. El contenido en 3-hidroxi-2-butanona oscilaba entre 265,29 mg/l de los vinagres de Jerez y 1326,9 mg/l para los vinagres balsámicos. Otros autores han observado un contenido elevado de 3-hidroxi-2-butanona para vinagres de manzana [15]. Se justifica como consecuencia de una baja aireación durante el proceso de acetificación. Palacios y col. [16] encontraron que el contenido de 3-hidroxi-2-butanona aumentaba en los vinagres de Jerez durante su envejecimiento en madera como consecuencia de la transformación del butilenglicol en su derivado durante el proceso de la fermentación acética, y de la pérdida general de agua que se producía durante este periodo por la evaporación. En nuestro caso, se encontraron elevadas cantidades de este compuesto en los vinagres 5 y 7.

Hexanal y *trans* 2-hexen-1-ol sólo se encontraron en los vinagres de manzana. Los vinagres balsámicos y de Pedro Ximénez mostraron elevadas cantidades de 2-furaldehído, 5-metil-2-furaldehído, 5-acetoximetil-2-furaldehído y 5-hidroximetil-2-furaldehído, como cabía esperar basándose en su proceso de producción.

Tabla IV.4. Compuestos volátiles ($\mu\text{g/l}$) encontrados en los vinagres.

Compuesto	Balsámico		Manzana		Jerez			Estragón	Pedro Ximénez	Vino blanco
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Isobutirato de etilo	17.29	24.36	0.208 ^b	4.43 ^b	51.38	104.06	15.24	12.86	531.80	40.10
Acetato de propilo	497.57	330.58	nd	246.58	305.77	178.92	136.30	nd	466.88	111.34
Acetato de isobutilo	1427.2	977.8	847.5	1591.0	941.07	489.92	440.40	210.60	920.63	1620.4
Butirato de etilo	27.20	14.50	48.25	762.72 ^a	20.99	34.01	13.37	1.03 ^b	285.60	28.19
Isovaleriano de etilo	14.15	14.13	19.40	20.59	196.00	344.66	92.97	55.55	766.94	170.93
Acetato de n-butilo	1.23 ^b	1.27 ^b	4.02 ^b	836.71	37.7	76.65	10.70	3.32 ^b	229.05	19.34
Hexanal	nd	nd	661.63	392.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isobutanol*	10.42	8.07	4.78	6.12	4.13	2.13	3.32	nd	4.86	7.11
Acetato de isopentilo	3257.1	1882.5	386.99	3230.4	2776.0	1549.2	1171.7	609.77	2682.7	5204.4 ^a
Valeriano de etilo	0.095	0.292	0.669	1.51	0.256	0.495	0.227	0.101	2.833	0.481
1-Butanol	40.96	51.06	59.64	103.22	96.27	98.18	77.75	54.3	68.96	62.82
trans-2-Hexenal	14.15 ^b	205.23	332.69	109.82	149.40	115.04	1.83 ^b	117.93	377.41	29.88 ^b
2-Metil-1-butanol*	24.85	21.96	8.63	11.10	12.20	8.08	3.55	0.424 ^b	21.83	27.66
Alcohol isoamílico*	29.64	23.13	9.61	23.50	12.57	10.12	8.11	5.36	16.77	26.28
3-Hidroxi-2-butanona*	1326.9	898.69	284.41	309.61	871.62	265.29	706.08	441.97	309.37	415.87
Caproato de etilo	0.999	0.399	10.30	7.84	10.20	8.70	1.42	4.71	25.60	2.57
Acetato de hexilo	0.140	0.172	89.23	401.40 ^a	0.314	1.95	0.039	0.021 ^b	6.80	0.694
Acetato de <i>cis</i> 3-hexen-1-ol	nd	nd	2.27	26.34	0.016 ^b	0.867	1.41	96.76	2.34	0.478
Lactato de etilo*	9.23	5.49	0.052 ^b	0.221	0.999	2.22	0.274	0.521	21.64	0.301
Hexan-1-ol	30.87	34.83	1869.6 ^a	6984.1 ^a	12.73 ^b	24.11 ^b	9.52 ^b	5.36 ^b	138.60	nd
<i>cis</i> 3-Hexen-1-ol	18.75 ^b	20.08 ^b	40.18	851.54	27.79	51.97	34.05	2158.8 ^a	34.58	77.06
<i>trans</i> 2-Hexen-1-ol	nd	nd	150.12	1941.6	nd	nd	nd	nd	50.00 ^b	nd
Octanoato de etilo	0.079 ^b	0.100 ^b	0.352	4.32	0.423	1.25	0.742	nd	1.88	1.39

1 y 2: vinagres balsámicos; 3 y 4: vinagres de manzana; 5-7: vinagres de Jerez; 8: vinagre al estragón; 9: vinagre de Pedro Ximénez; y 10: vinagre de vino blanco. Valores ^a fuera del rango de estudio; Valores ^b menores que el límite de detección; nd: no detectado. *: mg/l

Tabla IV.4 (continuación). Compuestos volátiles ($\mu\text{g/l}$) encontrados en los vinagres.

Compuesto	Balsámico		Manzana		Jerez		Estragón		Pedro Ximénez	Vino blanco
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	
2-Furaldehído*	9.66	13.46	5.08	2.82	1.97	15.69 ^a	1.93	11.59	9.11	3.08
Benzaldehído	77.53	22.27	116.28	51.62	343.91 ^a	197.14	137.97	159.39	142.01	388.83 ^a
Ácido isobutírico*	22.50	34.58	46.60	29.21	67.86	39.61	38.65	14.48	73.43	38.43
5-Metil-2-Furaldehído	2778.4 ^a	2802.5 ^a	13.12	nd	118.61	244.92	122.58	2.09 ^b	1371.7	328.52
2-Acetil-5-metilfurano	35.38	63.74	0.501 ^b	nd	9.87	4.40	3.92	nd	10.34	5.47
Ácido butírico*	7.73	12.25	5.23	8.29	16.86	7.28	16.00	4.22	14.01	8.18
Ácido isovalérico*	18.39	51.25	77.73	3.03	169.04	93.43	68.48	17.01	163.27	94.29
Succinato de dietilo*	1.05	1.36	0.041 ^b	0.135	0.122	0.109	0.178	0.012 ^b	1.85 ^a	0.251
α -terpineol	14.63	32.64	0.710 ^b	2.77	1.94	0.9131	2.14	5.92	11.75	2.91
Acetato de bencilo	1.71	15.11	0.501 ^b	0.032 ^b	100.19	112.34	10.57	0.321 ^b	299.50	22.26
2-Fenilacetato de etilo	8.05	9.42	1.59	1.22	34.92	56.85 ^a	12.22	14.00	143.58 ^a	18.65
Acetato de 2-feniletilo*	1.12	1.20	nd	0.185	1.53	1.02	0.597	0.804	1.24	2.33
Ácido hexanoico*	1.52	2.18	2.71	4.96 ^a	3.61 ^a	1.49	1.52	0.956	2.47	1.64
Alcohol bencílico	699.42	1207.1	67.28	58.99	1630.5	1975.5	747.87	333.42	5676.6	732.74
2-Feniletanol*	14.91	16.36	4.55	5.24	15.66	11.29	8.63	8.41	12.74	20.50
Ácido 2-etilhexanoico	0.112 ^b	nd	nd	6.04 ^b	66.83	0.121 ^b	23.92	nd	nd	22.01
4-Etilguaiaicol	40.58	37.53	nd	nd	56.99	11.69	28.33	20.11	3.97 ^b	24.22
Ácido octanoico*	1.41	1.24	0.6771	8.06 ^a	1.71	0.960	0.810	0.6763	1.15	1.02
Eugenol	4.15	4.91	5.66	122.06	7.66	5.76	5.16	47.64	4.17	4.92
4-Etilfenol	115.23	151.03	0.876 ^b	nd	209.54	126.34	100.33	32.53	50.61	61.15
5-Acetoximetil-2-furaldehído	4192.0 ^a	4284.5 ^a	50.76	nd	284.06	256.72	55.08	nd	4067.6 ^a	471.00
Ácido decanoico	305.71	112.92	9.88	1505.7	109.75	82.49	84.61	64.75	52.93	54.74
Ftalato de dietilo	0.326 ^b	0.966 ^b	1.14	1.54	5.84	4.49	3.82	0.805 ^b	2.30	6.22
5-Hidroximetil-2-furaldehído*	268.45	379.29 ^a	6.67	nd	12.28	16.53	3.30	6.73	295.74	30.64

1 y 2: vinagres balsámicos; 3 y 4: vinagres de manzana; 5-7: vinagres de Jerez; 8: vinagre al estragón; 9: vinagre de Pedro Ximénez; y 10: vinagre de vino blanco.

Valores ^a fuera del rango de estudio; Valores ^b menores que el límite de detección; nd: no detectado. *: mg/l

IV.3.3. Comparación entre SBSE y SPME para el análisis de compuestos volátiles en vinagre.

El método analítico de SBSE validado en este capítulo, se comparó con la metodología de SPME optimizada previamente por nuestro grupo de investigación para el análisis de los componentes volátiles en vinagre [12]. Ambas metodologías analíticas se usaron para analizar cinco vinagres suministrados por diferentes productores. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.5. Solamente aparecen en la tabla los volátiles analizados por ambas metodologías. No todo los compuestos que se midieron por SBSE fueron detectados empleando la SPME, pero aquellos que se cuantificaron por ambos métodos muestran valores similares de concentración. En la columna, una pendiente con valor de 1, significa una correlación perfecta entre la SBSE y la SPME. Como se puede observar, los coeficientes de correlación (r^2) para el análisis de los compuestos cuantificados por las dos técnicas siempre superaban el 0.9800 (tabla IV.5), indicando que los resultados obtenidos por ambos métodos, están en concordancia. Sin embargo, la SBSE es capaz de estudiar un mayor número de compuestos.

IV.4. Conclusiones.

Bajo las condiciones experimentales empleadas en este capítulo, la SBSE se puede considerar una técnica apropiada para el análisis de los compuestos volátiles en vinagres. Los límites de detección y cuantificación, y la precisión obtenidas para los diferentes compuestos volátiles son adecuados para su cuantificación en vinagres. El ácido acético compite en la extracción, pero para el análisis cuantitativo, puede usarse el patrón interno. Esta técnica está bastante en concordancia con la técnica SPME y, en general, presenta mejores valores de sensibilidad y de reproducibilidad.

Tabla IV.5. Comparación de la SPME y la SBSE para la determinación de compuestos volátiles en vinagres. Valores medios ($\mu\text{g/l}$, n:2). El primer valor para cada compuesto se obtuvo por SBSE.

Compuesto	M1	M2	M3	M4	M5	y = SBSE; x= SPME
Acetato de n-butilo*	78.15	25.52	8.65	nd	nd	$y = 1.0743x - 0.0027$ ($r^2 = 0.9999$)
	74.92	23.99	8.34	nd	nd	
Isobutanol*	4.03	8.20	5.06	8.03	4.07	$y = 1.0348x - 0.0480$ ($r^2 = 0.9908$)
	4.00	7.75	5.01	8.04	4.02	
Acetato de isopentilo*	3.20	2.37	3.56	3.59	0.90	$y = 0.9506x + 0.0489$ ($r^2 = 0.9787$)
	3.03	2.46	3.87	3.50	0.92	
Pentanoato de etilo	19.01	nd	nd	3.10	25.00	$y = 1.0287x - 0.001$ ($r^2 = 0.9988$)
	19.01	nd	nd	3.03	24.11	
2-Metil-1-butanol*	10.21	6.16	8.01	19.76	6.17	$y = 0.9513x + 0.4387$ ($r^2 = 0.996$)
	9.76	6.17	7.87	20.46	6.24	
Alcohol isoamílico*	9.70	5.61	6.41	16.28	2.19	$y = 0.9163x + 0.8125$ ($r^2 = 0.9938$)
	8.91	5.17	6.11	17.89	2.13	
3-Hidroxi-2-butanona*	508.74	424.76	322.02	120.55	443.13	$y = 0.9924x - 0.7747$ ($r^2 = 0.9868$)
	509.51	451.79	302.10	130.86	438.14	
Acetato de <i>cis</i> -3-hexen-1-ol	0.41	nd	nd	nd	0.51	-
	nd	nd	nd	nd	nd	
2-Furaldehído*	5.31	7.72	5.89	3.98	2.72	$y = 0.9454x + 0.3226$ ($r^2 = 0.9953$)
	4.72	7.71	5.81	4.40	2.48	
Benzaldehído*	0.06	0.12	0.68	0.04	0.40	$y = 1.0937x - 0.0113$ ($r^2 = 0.9962$)
	0.07	0.13	0.62	0.05	0.40	
Ácido isovalérico*	16.26	25.19	146.61	74.47	180.84	$y = 1.0360x + 0.5134$ ($r^2 = 0.9980$)
	14.62	25.65	134.93	72.35	178.06	
Succinato de dietilo*	0.21	2.79	0.40	1.49	0.31	$y = 0.9141x - 0.0132$ ($r^2 = 0.9817$)
	0.22	2.89	0.46	1.91	0.28	
Acetato de bencilo	7.05	1.91	21.44	1.91	5.34	$y = 0.8911x - 0.0287$ ($r^2 = 0.9908$)
	7.45	2.12	28.99	2.45	5.99	
2-Fenilacetato de etilo	11.82	1147.77	24.96	9.18	nd	$y = 1.0184x - 0.0004$ ($r^2 = 0.9990$)
	12.56	145.49	24.22	9.58	nd	
Acetato de 2-feniletilo*	0.21	0.21	0.18	1.97	4.16	$y = 0.9874x - 0.0485$ ($r^2 = 0.9848$)
	0.21	0.22	0.17	2.22	4.05	
Ácido hexanoico*	1.23	1.33	2.46	0.30	0.95	$y = 0.9400x + 0.0929$ ($r^2 = 0.9939$)
	1.13	1.35	2.55	0.27	0.90	

nd, no detectado

*, mg/l

Tabla IV.5 (continuación). Comparación de la SPME y la SBSE para la determinación de compuestos volátiles en vinagres. Valores medios ($\mu\text{g/l}$, n:2). El primer valor para cada compuesto se obtuvo por SBSE.

Compuesto	M1	M2	M3	M4	M5	y = SBSE; x= SPME
Alcohol bencílico*	1.93	0.47	1.86	2.73	0.47	$y = 0.9380x + 0.0325$ ($r^2 = 0.9961$)
2-Feniletanol*	2.13	0.48	1.95	2.80	0.44	$y = 0.9169x + 0.7095$ ($r^2 = 0.9972$)
4-Etilguaiaicol	31.05	11.02	58.23	22.49	19.55	$y = 0.9608x + 0.0056$ ($r^2 = 0.9942$)
	33.50	12.12	62.09	22.18	20.24	
Ácido octanoico*	9.30	154.51	125.56	nd	nd	$y = 0.9444x + 0.0691$ ($r^2 = 0.9866$)
	9.56	161.63	126.82	nd	nd	
4-Etilfenol	0.15	1.94	0.60	1.81	2.16	$y = 0.9309x + 0.0025$ ($r^2 = 0.9990$)
	0.14	1.78	0.54	1.95	2.26	
Ácido decanoico	237.54	62.84	749.38	130.05	12.04	$y = 0.9404x + 0.0043$ ($r^2 = 0.9905$)
	267.81	56.16	798.90	129.80	14.22	
	55.21	31.14	131.12	126.21	92.04	
	56.41	32.61	129.53	124.68	91.50	

nd, no detectado

*, mg/l

IV.5. Bibliografía.

- [1] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 47.
- [2] J. Marín, A. Zalacain, C. De Miguel, G.L. Alonso, M.R. Salinas, J. Chromatogr. A. 1098 (2005) 1.
- [3] M.S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara. Water Res. 38 (2004) 1679.
- [4] F. Luan, A. Mosandl, A. Münch, M. Wüst, Phytochemistry 66 (2005) 295.

- [5] F. Luan, A. Mosandl, M. Gubesch, M. Wüst, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 369.
- [6] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, *J. Agr. Food Chem.* 50 (2002) 449.
- [7] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [8] A. Buettner, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2339.
- [9] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 11.
- [10] J.C.R. Demyttenaere, J.I.S. Martinez, R. Verhe, P. Sandra, N. De Kimpe, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 221.
- [11] A. Isogai, H. Utsunomiya, R. Kanda, H. Iwata, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4118.
- [12] R. Natera, R. Castro, M.V. García-Moreno, F. García Rowe, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 261.
- [13] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J. L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [14] G. Blanch, J. Tabera, J. Sanz, M. Herraiz, G. Roglero, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1046.
- [15] C. Llaguno, “Definición y tipos de vinagre”, en: *El vinagre de vino*, ed. por C. Llaguno y M.C. Polo, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 1991, pág. 133.
- [16] V. Palacios, M. Valcárcel, I. Caro, L. Pérez, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4221.

V OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN POR ABSORCIÓN EN BARRA AGITADORA (SBSE) APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN VINAGRES.

V.1. Introducción.

Las plagas más importantes de la vid, y dentro del grupo de los insectos, son las polillas como *Lobesia botrana* y *Clysia ambiguella*, y los pulgones como *Eotetranychus carpini* y *Panoniclus ulmi*. Si señalamos las enfermedades más importantes, tenemos las producidas por los ataques de los hongos de tipo mildiu *Plasmopora viticola*, del tipo oidio *Uncinula necator* y el botrítico *Botrytis cinerea*. Existen también otras enfermedades producidas por bacterias y virus, así como la acción competitiva de las malas hierbas en el cultivo [1].

Para cada enfermedad típica, existe un amplio rango de pesticidas, de diferentes familias químicas, cada uno con una diferente forma de acción [2]. Actualmente son muchos los productos recomendados para el control de las plagas y enfermedades de la vid que, de una u otra forma, podrían llegar siguiendo las distintas fases de elaboración, hasta la obtención del vinagre como producto final.

La mayoría de los insecticidas y acaricidas autorizados pertenecen al grupo de los compuestos organofosforados, también utilizados en mezcla con aceites en tratamientos de invierno, mientras que los fungicidas más usados pertenecen a las familias de los tiocarbamatos, ftalimidas, bencimidazoles y dicarboximidias. Dentro de los herbicidas los más empleados son las triazinas y fenilureas [3].

Cuando se realiza un tratamiento fitosanitario queda una cierta cantidad de sustancia en la planta que se denomina depósito de plaguicida. Esta cantidad de plaguicida va disminuyendo progresivamente en el tiempo hasta quedar sólo el residuo en el momento de la recolección. Los que pueden presentar más problemas son aquellos que se aplican en las proximidades de la vendimia, como los antibotánicos [4].

La presencia de residuos de pesticidas en el vino, y por tanto en el vinagre final, dependen de diferentes factores, tantos como el número de etapas que comprenden el proceso de producción [5].

En España los residuos de pesticidas no están directamente legislados en vino, pero normalmente se regulan a través de unos estándares nacionales para productos alimentarios, como el límite máximo de residuos (LMR) en uvas vnicas. Hoy día existe la tendencia de disminuir el LMR para ser separado y dedicado estrictamente para el vino. La legislación está reduciendo la cantidad máxima permitida de pesticidas, con la clara intención de alcanzar “la tolerancia cero” [6, 7]. Esta tendencia también está siendo observada en el vinagre y un número cada vez mayor de productos está apareciendo en el mercado con la etiqueta de “producto ecológico”.

Otro factor es la calidad aromática del vino, y por tanto del vinagre, que puede ser modificada por la presencia de los residuos de pesticidas durante la fermentación [8, 9]. Se producen diferencias significativas en algunos componentes volátiles mayoritarios, así, clorpirifos o fenarimol aumentan la concentración de acetato de etilo y metanol, respectivamente. De entre los minoritarios, sólo algunos ésteres varían su concentración en presencia de clorpirifos, fenarimol o vinclozolina [10].

Si nos referimos a las concentraciones de ácidos orgánicos tales como tartárico, málico y láctico en vinos terminados, no presentan diferencias significativas con los vinos control, mientras que los ácidos, acético, cítrico y succínico sí que presentan algunas diferencias en ensayos que contienen residuos de clorpirifos, fenarimol, metalaxil, penconazol o mancozeb [11]. Del mismo modo que la presencia de los fungicidas ciprodinil, fludioxonil y pirimetanil en vinificaciones inoculadas con diversas especies de *Saccharomyces*, provocan diferencias significativas en los contenidos en ácidos orgánicos [12].

La presencia de los residuos de pesticidas y sus productos de degradación también puede influir negativamente en la estabilidad del vino terminado, produciendo una turbidez coloidal [13].

Por tanto, es interesante, desde el punto de vista comercial, poseer métodos sensibles y fiables para la determinación de los niveles de los productos fitosanitarios en vinagres, no sólo debido al efecto adverso que pudiera tener en las características organolépticas del vinagre [10], o debido al riesgo sobre la salud pública que pudiera representar la presencia de una gran cantidad de estos residuos, sino también por su implicación en la obtención de la denominación de “vinagre ecológico”.

Se ha desarrollado un gran número de métodos analíticos para la determinación de pesticidas en vinos mediante cromatografía gaseosa o cromatografía líquida. Normalmente previa a la separación cromatográfica, se requiere un tratamiento de la muestra [14-19]. La mayoría de dichos tratamientos suelen emplear bastante tiempo y consumo de disolvente. Las técnicas de preparación de muestra que no utilizan disolventes, basadas en la extracción por absorción han demostrado ser buenas alternativas a los métodos tradicionales como la extracción líquida [20].

La anteriormente mencionada y recientemente desarrollada extracción por absorción en barra agitadora (SBSE) [21-24] ha sido empleada para extraer analitos de una variedad de matrices. El mecanismo de extracción es similar al de la microextracción fase sólida (SPME) y está basado en la absorción del PDMS [25]. Como también dijimos antes, la ventaja de la SBSE es la mayor cantidad de PDMS disponible, lo que se traduce en mayores recuperaciones y una mayor capacidad de muestra [26]. Las aplicaciones desarrolladas con SBSE, que ha mostrado unos límites de detección bajos y una buena repetibilidad [27-29], confirman el gran potencial de esta técnica.

Se pueden encontrar algunas aplicaciones previas de esta técnica al análisis de pesticidas en vino [30, 31], pero nunca se ha aplicado muestras de vinagres.

El presente capítulo describe la optimización y validación de un procedimiento de extracción por absorción en barra agitadora y desorción térmica, acoplado a cromatografía gaseosa capilar con detección mediante espectrometría de masas, para la determinación de residuos de pesticida en vinagre.

V.2. Experimental.

V.2.1. Muestras de vinagre.

Para optimizar las condiciones de extracción y para determinar algunas características analíticas, como la recuperación y la precisión, se empleó una muestra de vinagre de Jerez comercial a la que se adicionaron

los pesticidas seleccionados. Después de la optimización y la validación se analizaron varias muestras de vinagre comercial.

V.2.2. Reactivos.

Los pesticidas empleados en el estudio (pirimetanil, flufenoxuron, clorpirifos-metil, vinclozolina, metalaxil, fenitrotion, malatión, dicofol, clorpirifos, ciprodinil, triadimenol, procimidona, hexitiazox, fludioxonil, iprodiona, benalaxil, fenhexamida) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (PESTANAL, Riedel-de Hæen, Seelze, Alemania). Se preparó una disolución madre estándar global pesando exactamente 5-10 mg de cada pesticida individualmente, en un matraz aforado de 50 ml y disolviendo con acetona, para diluir finalmente con metanol hasta el volumen de enrase. Las disoluciones de trabajo empleadas en el proceso de calibración se prepararon diluyendo diferentes cantidades de la disolución madre en un vinagre sintético (2 g/l de ácido tartárico, 80 g/l de ácido acético, 1 g/l de acetato de etilo y 10 ml/l de etanol en agua Milli-Q). Todas las disoluciones se mantuvieron a 4°C. Como patrón interno se empleó epóxido de heptacloro suministrado por Sigma-Aldrich. El cloruro sódico fue suministrado por Scharlau (Barcelona, España).

V.2.3. Preparación de muestra.

Las extracciones se llevaron a cabo con barras agitadoras comerciales de PDMS de 25 mm x 0.5 mm (longitud x anchura) suministradas por Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Alemania). Después de la optimización, y para cada análisis mediante SBSE, se pipetearon 40 ml de muestra (ya sea vinagre natural o sintético) y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 100 ml. A cada muestra se le añadieron 40 µl de una disolución de epóxido de heptacloro (3.42 mg/l en acetona). El matraz

Erlenmeyer se colocaba en un agitador magnético de quince posiciones (Mülheim a/d Ruhr, Alemania). La barra agitadora se agitaba a 1000 rpm durante 150 minutos y a 25°C. Después de sacarla de la muestra de vinagre, la barra agitadora se colocaba durante unos segundos en agua destilada y se secaba suavemente con papel. Posteriormente, se transfería al tubo de vidrio de desorción térmica y se llevaba a cabo dicha desorción.

Después de cada análisis y para eliminar completamente todos los residuos de pesticidas que la barra agitadora pudiera retener, se llevaba a cabo un procedimiento de limpieza (300°C durante quince minutos). Después de dicho procedimiento no se detectó ninguna señal que correspondiera a residuos de pesticidas.

V.2.4. Instrumental.

Las barras agitadoras se desorbieron térmicamente empleando una unidad de desorción térmica TDS-2 (Gerstel) conectada a un inyector CIS-4 (Gerstel) de vaporización mediante temperatura programada (PTV) a través de una línea de transferencia de calor. El inyector PTV estaba instalado en un sistema Agilent 6890 GC-5973 MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). En el inyector PTV se usó un liner vacío. La unidad de termodesorción estaba equipada con un automuestreador MPS 2L (Gerstel) con capacidad de muestrear hasta un total de 98 barras agitadoras. La temperatura de desorción se programó desde 30°C hasta 300°C (manteniendo esta temperatura durante 10 minutos) a una velocidad de 60°C/min bajo flujo de helio (75 ml/min) y los analitos desorbidos fueron crioconcentrados en el sistema PTV con nitrógeno líquido a -150°C. Finalmente el sistema PTV se programó desde -150°C hasta 300°C (manteniendo durante 5 minutos esta temperatura) a una velocidad de 10°C/s para el análisis por GC-MS. Los análisis de GC-MS capilar en el modo de impacto electrónico se llevaron a

cabo usando un sistema Agilent 6890 GC-5973N MS (Agilent, Little Falls, DE, EE.UU.) equipado con una columna capilar HP-5 (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 30 m x 0.25 mm de diámetro interno, con un recubrimiento de 0.25 μm . El gas portador fue el helio, usando un flujo de 1 ml/min. El horno de cromatografía gaseosa fue programado como se explica a continuación: mantenimiento a 70°C durante 2.5 minutos, en ese momento se producía una rampa de temperatura de 25°C/min hasta llegar a 150°C. A continuación se alcanzaban los 200°C a una velocidad de 3°C/min y los 300°C a 8°C/min, manteniéndose durante 10 minutos. El detector de masas operó en modo EI+ a 70eV. Se empleó el modo SIM (selected ion monitoring), empleando para cada compuesto un ión cuantificador y dos o tres iones cualificadores.

La señal fue recogida y procesada con una librería RTL de pesticidas suministrada por Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.). La identificación de picos se llevó a cabo mediante analogías con los espectros de masas y fue confirmada por los tiempos de retención de los patrones.

Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa del pico del ión molecular en relación a la del epóxido de heptacloro, el patrón interno. La iprodiona mostró una baja estabilidad térmica y fue medida a través de su producto de degradación, la (3,5-diclorofenil)hidantoína [30].

La tabla V.1 muestra los pesticidas estudiados con sus tiempos de retención y sus iones seleccionados, mientras que en la figura V.1 se observa un cromatograma con todos los pesticidas estudiados.

Tabla V.1. Pesticidas estudiados: tiempos de retención e iones seleccionados.

Nº.	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Iones seleccionados* (m/z)
1	Pirimetanol	13,19	198, 199, 200
2	Flufenoxuron	14,15	305, 126, 307
3	Clorpirifos-metil	15,26	286, 288, 125
4	Vinclozolina	15,34	212, 198, 285, 187
5	Metalaxil	15,94	206, 249, 160
6	Fenitrotion	16,61	125, 277, 109, 260
7	Malation	17,33	173, 127, 125, 93
8	Dicofol	17,61	139, 250, 111
9	Clorpirifos	17,69	197, 199, 314, 97
10	Ciprodinil	18,97	224, 225, 210
11	Triadimenol	19,95	112, 168, 128
12	Procimidona	20,17	96, 283, 285, 67
13	Hexitiazox	20,33	156, 155, 227, 184
14	Fludioxonil	22,57	248, 127, 154, 182
15	Iprodiona **	24,31	187, 244, 189
16	Benalaxil	25,45	148, 91, 206
17	Fenhexamida	25,55	97, 177, 55

* El primero de cada compuesto es su ion cuantificador, el resto son los iones cualificadores.

** Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

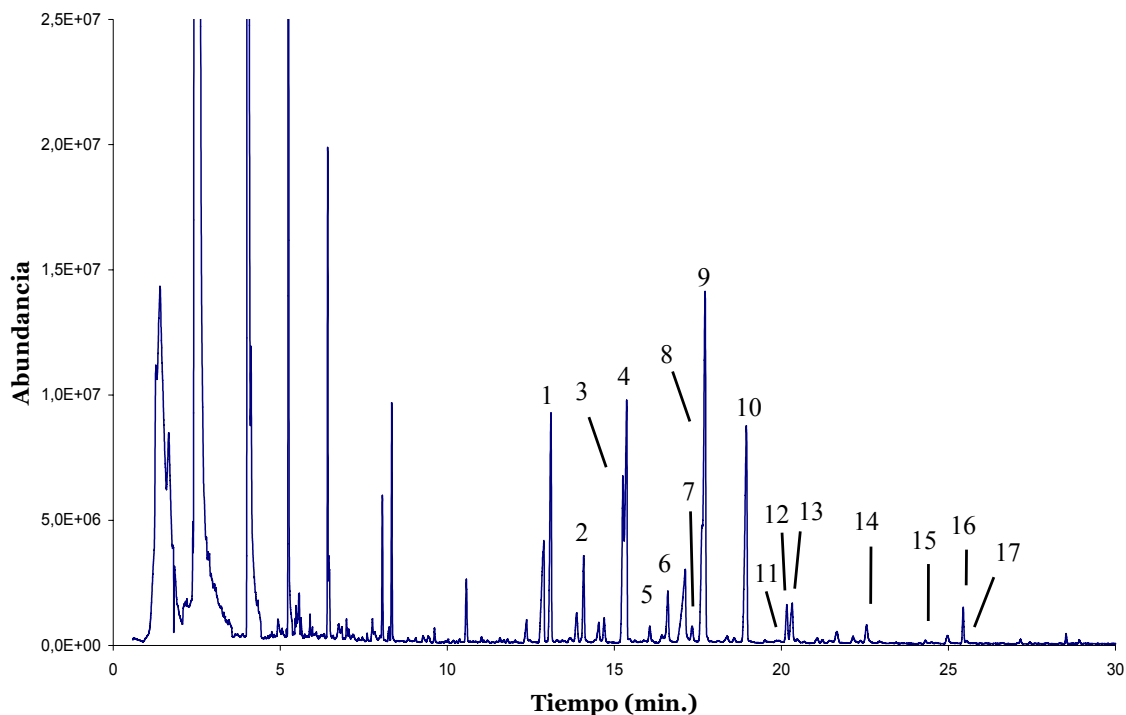


Figura V.1. Cromatograma de una mezcla de todos los pesticidas estudiados, obtenido por SBSE.

V.2.5. Diseño experimental.

Para el tratamiento de datos se empleó el programa estadístico “Statgraphics Plus 5.0” para Windows 98.

Se seleccionó una exploración secuencial de la respuesta, que se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa, para establecer la influencia relativa de los factores y de sus interacciones sobre el área cromatográfica total obtenida, relativa a los iones cuantificadores elegidos, se seleccionaron cuatro factores: el tiempo de extracción, el volumen de muestra, la velocidad de agitación y el efecto de la fuerza iónica.

Por tanto se eligió un diseño factorial 2^4 (16 experimentos, por duplicado, llevados a cabo en orden aleatorio para evitar el efecto de las variables lurking u ocultas). Los valores correspondientes a los puntos altos (+), y bajos (-) de cada factor se muestran en la tabla V.2.

Tabla V.2. Niveles de los factores para la optimización de las condiciones de extracción.

Factor	Bajo (-)	Alto (+)	Centro	Axial ($-\alpha$)	Axial ($+\alpha$)
Volumen de muestra (ml)	10	40	25	5.7	44.3
NaCl (M)	2.0	4.0	1.0	1.71	4.28
Tiempo de extracción (min)	20	150	85	1.3	167
Velocidad de agitación (rpm)	500	1500			

En la segunda fase, este diseño factorial de dos niveles se expandió a un diseño de estrella. Se obtuvo un diseño central compuesto (CCD, con $\alpha=2.0796$) puesto que los centros de los dos diseños por separado, coincidían. La tabla V.2 muestra los valores dados para cada factor.

V.3. Resultados y discusión.

V.3.1. Estudio previo.

Baltussen y col. [21] encontraron que la cantidad total de compuestos semivolátiles extraídos mediante SBSE dependía de la relación entre las fases de volumen de muestra y volumen de PDMS. Por tanto, antes de optimizar las condiciones de extracción, se llevó a cabo un estudio para

determinar el Twister (barra agitadora) más apropiado. Se le añadieron pesticidas a una muestra de vinagre comercial, y fue extraído con cuatro twisters de PDMS de diferentes longitudes (10 mm ó 20 mm) y anchuras (0.5 mm ó 1.0 mm). En base a los resultados obtenidos, se seleccionó el Twister de PDMS de 0.5 mm x 20 mm. De este modo se conseguía una mayor área cromatográfica para todos los pesticidas, sin exceder la capacidad de la columna.

V.3.2. Optimización de las condiciones de extracción.

Se evaluaron el tiempo de extracción, el volumen de muestra, la velocidad de agitación y la adición de diferentes cantidades de cloruro sódico para conseguir las mejores condiciones analíticas globales. El factor temperatura de extracción tenía una influencia significativa en la eficiencia de la SBSE, pero una temperatura elevada reduce la vida útil de la fase PDMS [32], por lo que en este trabajo, la temperatura de extracción fue fijada en 25°C.

Como respuesta experimental a optimizar se seleccionó el área cromatográfica total de los iones cuantificadores, correspondientes a todos los pesticidas estudiados. Además, no se consideró la optimización de las condiciones de desorción (tiempo y temperaturas de desorción, flujo de helio y temperatura del criocentración), teniendo en cuenta que en un estudio previo [29] se encontró que solamente mostraban un efecto leve sobre las señales cromatográficas.

V.3.2.1. Barrido mediante un diseño factorial 2⁴.

El diseño inicial de barrido servía para detectar aquellas variables que tenían más influencia sobre la respuesta experimental. Los datos

obtenidos se evaluaron mediante ANOVA con un nivel de significación del 5%. Estos resultados se muestran en un diagrama de barras (figura V.2). Los parámetros más significativos fueron el tiempo de extracción, el volumen de muestra y la concentración de cloruro sódico. El tiempo de extracción fue la variable más influyente. Todos los factores significativos afectaban con signo positivo, a excepción de la concentración de cloruro sódico.

Como se puede observar en la figura V.2, la eficiencia de la SBSE también está afectada por variables interrelacionadas. La interacción entre los factores tiempo de extracción y volumen de muestra aparece como la interacción estadísticamente más significativa, con un signo positivo. Las interacciones entre tiempo de extracción-velocidad de agitación y volumen de muestra-cloruro sódico también fueron significativas, signo negativo.

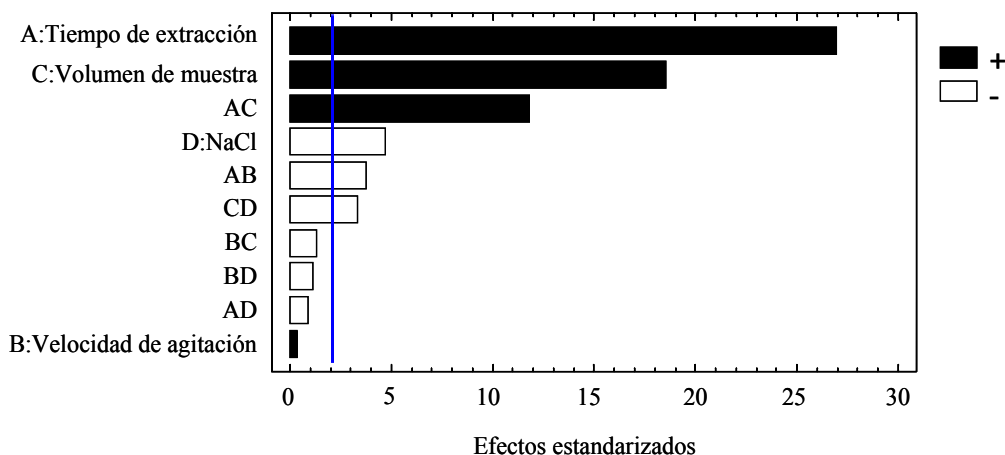


Figura V.2. Diagrama de Pareto para los efectos principales en el diseño factorial 2^4 para los pesticidas estudiados.

V.3.2.2. Optimización mediante un diseño central compuesto.

Puesto que la velocidad de agitación no demostró ser un parámetro significativo, en este estudio se decidió eliminar este factor, fijándose en

1000 rpm. Para el diseño central compuesto (CCD), los tres parámetros utilizados fueron: tiempo de extracción, volumen de muestra y cantidad de cloruro sódico. Los valores axiales para estos parámetros se localizaban en una esfera envolviendo al diseño factorial de dos niveles (tabla V.2).

Después del CCD, y tal y como se esperaba de los experimentos de barrido, el tiempo de extracción y el volumen de muestra se mostraron como parámetros estadísticamente significativos, con un signo positivo (tabla V.3). León y col. [22] observaron que para los compuestos apolares ($\log K_{o/w} > 3.5$), volúmenes de muestra mayores aumentaban las respuestas cromatográficas, mientras que para los analitos polares, volúmenes de muestra mayores tenían un efecto pequeño en las señales obtenidas.

Tabla V.3. Principales efectos y sus interacciones en el diseño central compuesto.

Efecto	relación F	P valor
A: Tiempo de extracción	673.12	0.0000 ^A
B: Volumen de muestra	338.03	0.0000 ^A
C: NaCl	0.26	0.6147
AA	50.70	0.0000 ^A
AB	82.94	0.0000 ^A
AC	0.01	0.9417
BB	5.07	0.0352 ^A
BC	0.85	0.3657
CC	0.32	0.5792

^A Valores significativos para $p < 0.05$

En referencia al tiempo de extracción, en la SBSE normalmente se requieren tiempos de extracción elevados para alcanzar el equilibrio [22, 26]. Además, no es práctico usar la capacidad completa de la fase de extracción para muchas aplicaciones. Se pueden obtener valores buenos de precisión y reproducibilidad cuando se controlan estrictamente las condiciones.

De las interacciones entre los dos factores, basándose en valores de *p*-valor y relación-*F* de los datos de ANOVA (tabla V.3), la interacción entre el tiempo de extracción y el volumen de muestra, fue la más significativa estadísticamente.

La superficie de respuesta obtenida, representando tiempo de extracción frente a volumen de muestra, se presenta en la figura V.3. Como se puede observar, un tiempo de muestreo elevado (150 minutos), produce la extracción de una mayor cantidad de pesticidas cuando se emplean volúmenes de muestra elevados. Para tiempos de extracción cortos, el uso de un mayor volumen de muestra aumenta el área cromatográfica total de una manera leve.

En relación a la adición de cloruro sódico, ésta no fue estadísticamente significativa para el diseño central compuesto, mientras que para el diseño de barrido inicial tenía una influencia negativa en la respuesta experimental. Teniendo en cuenta estos resultados, se llevó a cabo un estudio con y sin la adición de cloruro sódico. Una muestra de vinagre con pesticidas añadidos se extrajo cinco veces con adición de cloruro sódico (1.71 M), y cinco veces sin ninguna adición. Los resultados mostraron que no había diferencia estadísticamente significativa entre los dos tipos de muestra para la mayoría de los pesticidas considerados.

Además, varios autores han descrito [22, 26] que la recuperación para los solutos más hidrófilos ($\log K_{o/w} < 3.5$) aumentaba dramáticamente con el incremento de la concentración de cloruro sódico; sin embargo, la recuperación de los solutos más hidrófobos ($\log K_{o/w} > 5$) disminuía considerablemente. En nuestro caso, los pesticidas estudiados exhiben un $\log K_{o/w} > 3$, por lo que son bastante apolares y la adición de cloruro sódico podría disminuir sus recuperaciones.

Por otra parte la sal podría dañar la barra agitadora cuando no está completamente disuelta, por lo que se decidió eliminar este parámetro.

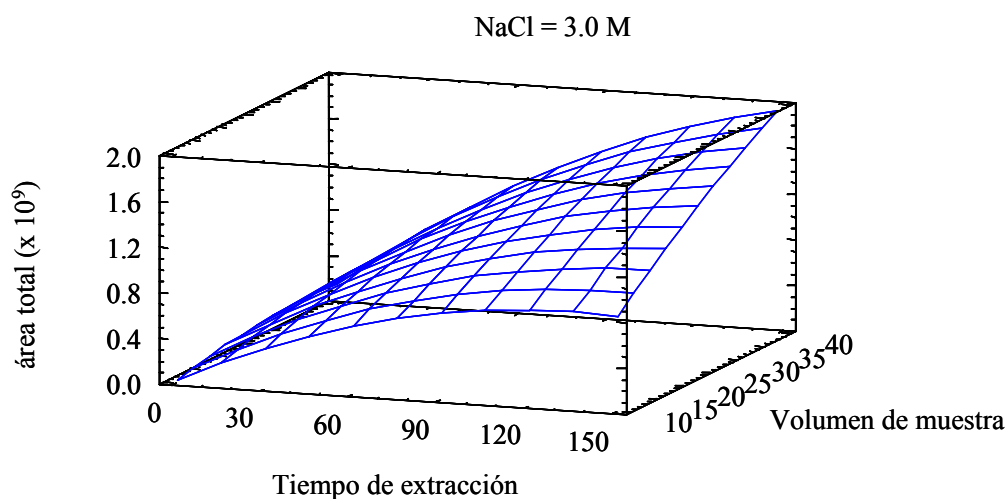


Figura V.3. Superficie la respuesta estimada obtenida a partir del diseño central compuesto al representar tiempo de extracción frente a volumen de muestra.

Resumiendo, después de la evaluación de los principales factores y de sus interacciones, las mejores condiciones para extraer pesticidas del vinagre fueron:

- ✓ Volumen de muestra: 40 ml
- ✓ Tiempo de muestreo: 150 min
- ✓ Velocidad de agitación: 1000 rpm
- ✓ Sin adición de cloruro sódico

V.3.3. Características analíticas.

V.3.3.1. Calibración y linealidad.

Se analizaron siete niveles de concentración por triplicado, cubriéndose los rangos de concentración esperados para los diferentes pesticidas en vinagres.

Para cada compuesto se empleó la relación [pesticida/patrón interno] del área de pico del ión molecular de cada pesticida empleado. El rango de linealidad estudiado para cada compuesto se muestra en la tabla V.4. Los coeficientes de correlación obtenidos para cada compuesto (tabla V.4) fueron buenos ($r^2 > 0.99$). Esto también fue corroborado por la “linealidad on-line (LOL) = $100 - \text{RSD}(b)$ ”, con valores superiores al 97% (tabla V.4). La $\text{RSD}(b)$ es la desviación estándar relativa de la pendiente (expresada como porcentaje).

V.3.3.2. Límites de detección y cuantificación y recuperación.

Los límites de detección y cuantificación se calcularon a partir de las curvas de calibrado construidas para cada pesticida empleando el programa informático Alamin [33].

Tabla V.4. Características de las curvas de calibrado.

Compuesto	Rango lineal (µg/l)	r ²	Linealidad (LOL, %)	Pendiente ± D.E.	Ord. Orig. ± D.E.
Pirimetaniil	0.54-540	0.9999	99.71	0.0079±0.0000	-0.0047±0.0048
Flufenoxuron	1.08-540	0.9994	99.11	0.0871±0.0008	-0.0199±0.1917
Clorpirifos-metil	0.51-510	0.9991	99.28	0.3367±0.0024	-0.8937±0.5199
Vinclozolina	0.46-460	0.9996	99.46	0.0499±0.0003	0.0368±0.0482
Metalaxil	1.05-1050	0.9965	98.36	0.0002±0.0000	0.0017±0.0015
Fenitrotion	0.5-100	0.9943	97.64	0.0194±0.0005	-0.0267±0.0210
Malation	0.8-160	0.9940	96.81	0.0074±0.0002	-0.0177±0.0192
Dicofol	0.47-470	0.9992	99.37	0.3112±0.0020	-0.5738±0.3566
Clorpirifos	0.43-430	0.9994	99.30	0.2806±0.0020	0.4549±0.3284
Ciprodinil	0.55-550	0.9996	99.40	0.0085±0.0003	-0.0032±0.0724
Triadimenol	1.01-202	0.9933	97.80	0.0007±0.0000	-0.0025±0.0015
Procimidona	0.49-490	0.9981	99.05	0.0208±0.0002	-0.0356±0.0375
Hexitiazox	1-100	0.9957	97.67	0.1207±0.0028	-0.2630±0.1411
Fludioxonil	0.65-130	0.9931	97.07	0.0095±0.0003	0.0049±0.0167
Iprodiona **	1.09-218	0.9927	97.24	0.0018±0.0000	0.0074±0.0049
Benalaxil	0.48-96	0.9974	98.32	0.0425±0.0007	0.0429±0.0315
Fenhexamida	0.9-900	0.9996	99.38	0.0008±0.0000	0.0180±0.0019

* Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

Los límites de detección (tres veces la desviación estándar relativa de los valores del blanco analítico calculados a partir de la curva de calibrado) y de cuantificación (diez veces la desviación estándar relativa de los valores del blanco analítico calculados a partir de la curva de calibrado) obtenidos son lo suficientemente bajos para determinar estos compuestos en muestras reales de vinagre (tabla V.5).

Se usó la técnica de las adiciones estándar para comprobar la precisión del método. Una muestra de vinagre representativa se empleó como matriz y se le añadieron cantidades conocidas de la disolución stock a siete niveles de concentración y por triplicado. Las pendientes de las curvas así obtenidas para cada uno de los pesticidas se compararon con las pendientes correspondientes obtenidas a partir del calibrado con patrones (criterio t). En general, no se encontraron diferencias significativas entre ellos para un p -valor < 0.05 .

La tabla V.5 proporciona los datos para la recuperación de cada pesticida, determinados a partir de la pendiente de la curva obtenida al representar la concentración encontrada frente a la concentración esperada. Se obtuvieron buenas recuperaciones, con valores oscilando entre el 91 y el 110%.

V.3.3.3. Repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad y reproducibilidad han sido evaluadas a partir de cinco series de cinco extracciones de un vinagre de Jerez comercial, al que se añadieron los pesticidas seleccionados, empleando cinco twisters diferentes.

Se calcularon las desviaciones estándares relativas (RSD), como se muestran en la tabla V.5. Los valores de RSD obtenidos para cada twister oscilaban entre el 1.77 y el 17.16%. La precisión inter-twister tomó valores similares a la precisión intra-twister (2.06-22.22%). En general, se obtuvieron valores de RSD menores al 10%, lo que confirma la elevada reproducibilidad de esta técnica.

Tabla V.5. Características analíticas

Compuesto	Límite de detección (LOD, µg/l)	Límite de cuantificación (LOQ, µg/l)	Recuperación (%)	Repet. (RSD, %)	Reprod. (RSD, %)
Pirimetaniil	0.18	0.60	109.39	4.09	7.80
Flufenoxuron	0.19	0.63	102.59	4.36	22.22
Clorpirifos-metil	0.23	0.77	93.20	5.91	2.06
Vinclozolina	0.16	0.53	97.34	1.77	3.37
Metalaxil	0.81	2.7	101.78	5.78	16.99
Fenitrothion	0.34	1.13	109.81	10.31	7.93
Malation	0.65	2.16	107.72	8.09	6.38
Dicofol	0.19	0.63	99.58	2.94	4.39
Clorpirifos	0.15	0.50	97.45	4.56	4.19
Ciprodinil	0.25	0.83	109.11	5.09	9.10
Triadimenol	0.64	2.13	96.27	17.16	14.40
Procimidona	0.30	1.00	99.81	6.23	6.61
Hexitiazox	0.14	0.46	92.93	8.58	4.34
Fludioxonil	0.60	2.00	91.69	6.94	8.49
Iprodiona **	0.77	2.56	94.65	10.11	4.76
Benalaxil	0.13	0.43	99.16	8.46	16.47
Fenhexamida	0.26	0.86	109.32	16.26	8.55

* Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

V.3.4. Determinación de residuos de pesticida en vinagres.

Este método analítico se empleó para analizar muestras de vinagres comerciales de diferentes materias primas (vinagres de vinos de Jerez y no de Jerez, vinagres de manzana y vinagres balsámicos) y con diferentes periodos de envejecimiento en madera. Cada muestra fue analizada por triplicado.

La media de los resultados obtenidos se muestra en la tabla V.6. En la bibliografía no existen datos disponibles referentes a las concentraciones de pesticidas en vinagres. El ciprodinil y el fludioxonil fueron encontrados en concentraciones que iban desde 0.9 a 28.6 $\mu\text{g/l}$ en vinos blancos gallegos [34]. Scarponi y Martinetti [35] determinaron estos mismos fungicidas en vinos blancos y rosados italianos, a niveles de 30 $\mu\text{g/l}$ para el ciprodinil y 34 $\mu\text{g/l}$ para el fludioxonil. La iprodiona y la vinclozolina se encontraron en varios vinos analizados por Pietschmann y col. [36]. En el caso de los vinos blancos y tintos italianos, alrededor del 57% de los vinos estudiados dieron análisis positivo para uno o más de los pesticidas normalmente empleados en las uvas [37].

En las muestras estudiadas, la mayoría de los pesticidas no fueron detectados, o sus concentraciones fueron más bajas que los límites de cuantificación calculados.

Las mayores concentraciones para varios pesticidas se encontraron en vinagres balsámicos, oscilando entre 146.21 $\mu\text{g/l}$ para el metalaxil y 2.91 $\mu\text{g/l}$ para el pirimetanil. Como se puede observar, solamente aparecen pequeñas cantidades de los pesticidas empleados en las uvas y/o manzanas, debido posiblemente a su degradación y precipitación durante los procesos de fermentación y clarificación [38].

V.4. Conclusiones.

Se han optimizado las condiciones para el análisis de residuos de pesticidas en vinagres empleando la SBSE-TD-GC-MS mediante aproximaciones estadísticas. Bajo las condiciones optimizadas empleadas en este estudio, podemos considerar apropiada la técnica SBSE para el análisis

de este tipo de compuestos en vinagres. Es una técnica muy simple, rápida y no emplea disolventes. Los límites de detección y cuantificación, y las recuperaciones que se han obtenido, son adecuados para la cuantificación de estos compuestos en vinagres y, especialmente, para el seguimiento de productos ecológicos, en los que el uso de los pesticidas no está permitido.

Tabla V.6. Residuos de pesticidas ($\mu\text{g/l}$) encontrados en vinagres comerciales.

Compuesto	Vinagres de Jerez		Vinagres de vino no de Jerez		Vinagres de manzana		Vinagres balsámicos	
	1	2 ^a	3	4	5	6	7	8 ^a
Pirimetanil	<L.D.	<L.D.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22.28	2.91
Flufenoxuron	n.d.	n.d.	<L.D.	<L.D.	n.d.	n.d.	n.d.	<L.D.
Clorpirifos-metil	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.
Vinclozolina	n.d.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	n.d.	<L.D.
Metalaxil	n.d.	n.d.	186.03	n.d.	n.d.	n.d.	146.21	32.82
Fenitrothion	<L.D.	n.d.	n.d.	n.d.	<L.D.	n.d.	n.d.	n.d.
Malation	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dicofol	<L.D.	<L.D.	<L.D.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Clorpirifos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<L.D.	n.d.
Ciprodinil	n.d.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	<L.D.	2.95	8.90	3.43
Triadimenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29.87	n.d.
Procimidona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.50	3.61
Hexitiazox	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fludioxonil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.62	n.d.
Iprodiona **	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.71	n.d.
Benalaxil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<L.D.	n.d.	n.d.
Fenhexamida	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.27	n.d.

*: Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

^a: vinagres envejecidos

n.d.: no detectado

<L.D.: por debajo del límite de detección

V.5. Bibliografía.

- [1] R. Barbieri, *Vitivinicultura* 28 (1988) 13.
- [2] C. De Liñán, *Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales*, Ediciones Agrotécnicas, 2000.
- [3] P. Cabras, A. Angioni, *J. Agric. Food Chem.* 48(4) (2000) 967.
- [4] C. Sala, F. Foro, O. Busto, F. Zamora, L. Arola, J. Guasch, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3668.
- [5] H. Otteneder, P. Majerus, *Bulletin de l'O.I.V.* 78(889-890) (2005) 173.
- [6] C.M. Cooney, *Environ. Sci. Technol.* 30(9) (1996) 380A.
- [7] J. A. Pascual, M. Ros, P. Fernández, A. Bernal, A. Lacasa, *Internantional Conference on Waste Management and the Environment II*, V. Popov, Grecia, 2004; pág. 251.
- [8] M.A. García, J. Oliva, A. Barba, M.A. Cámara, F. Pardo, E.M. Díaz-Plaza, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1241.
- [9] C. Aubert, R. Baumes, Z. Günata, J.P. Lepoutre, J.F. Cooper, C. Bayonove, *Journal International des Sciences de la Vigne and du Vin*, 1997.
- [10] J. Oliva, S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, M.R. Salinas, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2830.
- [11] J. Oliva, A. Barba, G. Navarro, G.L. Alonso, S. Navarro, *Vitic-Enol. Prof.* 59 (1998) 35.
- [12] J. Oliva, M.A. García, S. Navarro, F. Pardo, A. Barba, *Enólogos* 9 (1999) 18.
- [13] I. Guguchkina, N.M. Ageeva, *Sadovodstvo I Vinogradarstvo I Vinodelie Moldovy*, 12 (1990) 34.
- [14] P. Cabras, C. Tuberoso, M. Melis, M.G. Martini, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 817.
- [15] G.E. Miliadis, N.G. Tsiropoulos, P.G. Aplada-Sarlis, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 113.

- [16] L.F. López, A.G. López, M.V. Riba, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 684.
- [17] M.L. Hopper, *J. AOAC Int.* 71 (1988) 731.
- [18] A.M. Vitali, M. Guidotti, R. Giovinazzo, O. Cedrone, *Food Addit. Contam.* 25 (1998) 280.
- [19] M. Correia, C. Delerue-Matosb, A. Alves, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 59.
- [20] R. Castro, R. Natera, P. Benítez, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004), 141.
- [21] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [22] V.M. Leon, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Munoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [23] A. Stopforth, A. Tredoux, A. Crouch, P. van Helden, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 135.
- [24] J. Díez, C. Domínguez, D.A. Guillén, R. Veas, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 263.
- [25] C. Grote, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 587.
- [26] C. Blasco, M. Fernández, Y. Pico, G. Font, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- [27] P. Popp, P. Keil, L. Montero, M. Rückert, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 155.
- [28] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 11.
- [29] E. Duran, R. Natera, R. Castro, C. Garcia Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104(1-2) (2006) 47.
- [30] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 117.
- [31] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.

- [32] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, *J. Chromatogr. A*, 1095 (2005) 1.
- [33] A. M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J. L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [34] R. Rail, C. Yagüe, B. Cancho, J. Simal, *J. Chromatogr. A*, 942 (2002) 41.
- [35] L. Scarponi, L. Martinetti, *Vignevini* 1 (1999) 27.
- [36] M. Pietschmann, H. Hupf, A. Rappl, *Lebensmittelchemie* 54 (2000) 102.
- [37] M. Vitali, M. Guidotti, R. Giovinazzo, O. Cedrone, *Food Addit. and Contam.* 15 (1998) 280.
- [38] G.J. Soleas, D.M. Goldberg, *J. Wine Res.* 11 (2000) 197.

VI MÉTODO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN VINAGRES BALSÁMICOS TRADICIONALES.

VI.1. Introducción.

El vinagre balsámico tradicional es apreciado en todo el mundo debido a su calidad certificada, extremadamente alta. Sus propiedades fisicoquímicas por tanto, han sido estudiadas por diferentes autores, como pueden ser los ácidos carboxílicos [1], ácidos fenólicos [2], compuestos furánicos [3], microbiología [4, 5], metales pesados [6], así como las relaciones entre diferentes parámetros [7-9].

En matrices complejas sometidas a procesos de envejecimiento, el estudio del aroma juega un papel fundamental para determinar la calidad del producto final. En el caso del vinagre balsámico tradicional, debido a su complejidad, solamente existen un reducido número de publicaciones en relación al análisis de los compuestos volátiles [10-13]. En consecuencia, todavía hoy la extracción y concentración de compuestos volátiles en el vinagre balsámico tradicional constituye un problema que no ha sido satisfactoriamente resuelto. En particular, el elevado porcentaje de ácido acético presente en el vinagre balsámico tradicional, representa un serio problema, tanto por la respuesta cromatográfica, debido a su elevada señal, como para el proceso de extracción en fase sólida, puesto que el ácido acético actúa él mismo como disolvente [14].

En este capítulo se describe el desarrollo (la optimización y la validación) de un método de extracción fase sólida acoplado a la cromatografía gaseosa capilar con detección de espectrometría de masas aplicado a la determinación de compuestos volátiles en vinagre balsámico

tradicional. La optimización de las condiciones de extracción se ha llevado a cabo empleando un diseño de experimentos. Este diseño permite la variación simultánea de todos los factores experimentales estudiados, y la detección de posibles interacciones entre ellos que pudieran influenciar el resultado final pero que no serían detectables mediante métodos experimentales clásicos [15, 16]. Teniendo en cuenta la complejidad (una densidad extraordinaria y el previamente mencionado elevado contenido de ácido acético) de nuestra matriz, se evaluaron la cantidad de muestra, el volumen de eluyente, el volumen de agua de lavado y la dilución de la muestra. Los efectos de estos parámetros se investigaron empleando un diseño factorial de dos niveles, expandido posteriormente a un diseño central compuesto. La yuxtaposición del diseño factorial de dos niveles con un diseño de estrella (coincidiendo los centros de ambos diseños) proporcionan el mencionado diseño compuesto. Es una de las herramientas más usada para la estimación de superficies de respuesta multifactor y se ha empleado previamente con excelentes resultados para el estudio de los compuestos volátiles y pesticidas en vinagres de Jerez [17-18].

VI.2. Experimental.

VI.2.1. Muestras de vinagre.

Debido al elevado número de experimentos necesarios para la optimización y la escasez de vinagre balsámico tradicional disponible, se empleó una muestra compuesta por vinagre balsámico tradicional (40%) y por vinagre balsámico industrial (60%) para optimizar las condiciones de la extracción en fase sólida y para determinar las características del calibrado del método. Después de la optimización y validación, se analizaron dos muestras de vinagres balsámicos tradicionales con diferente envejecimiento, empleando esta metodología.

VI.2.2. Reactivos químicos.

Se estudiaron dos rellenos de cartucho de SPE diferentes; cartuchos LiChrolut-EN (200 mg) suministrados por Merck (Darmstad, Alemania), y cartuchos C18 Isolute (1g y 2g) suministrados por IST (Hengoed, Mid-Glamorgan, Reino Unido).

Los patrones de los volátiles empleados en este estudio fueron suministrados por Aldrich (Milano, Italia) y Sigma Chemicals (St. Louis, MO, EE.UU.).

Se prepararon disoluciones concentradas individuales para cada compuesto, pesadas en etanol absoluto. Se preparó una disolución stock que contuviera a todos los compuestos en único matraz aforado, por dilución a partir de cada disolución individual. Esta disolución stock se empleó para preparar las disoluciones de trabajo para la realización de las curvas de calibrado y para la validación del método. Se prepararon en diclorometano para alcanzar un volumen de 0.5 ml por evaporación, empleando nitrógeno, antes de la inyección en el GC-MS. Todas las disoluciones de trabajo fueron almacenadas a 4°C.

Se usó como patrón interno, 2-octanol (514 mg/l en etanol absoluto).

VI.2.3. Preparación de muestra.

Los cartuchos de extracción se acondicionaron con 4 ml de diclorometano, seguidos de 4 ml de metanol y 4 ml de agua.

Después de la optimización, la extracción se llevó a cabo pasando 7 g de muestra, diluida 1:4 en agua Milli-Q a una velocidad aproximada de 1.5 ml/min, a través del cartucho de SPE. Después de este paso, y sin llevar el cartucho a sequedad, se realizaba un proceso de lavado con 5 ml de agua. Con posterioridad al proceso de lavado, el cartucho se secaba mediante el paso del aire. Los compuestos eran recuperados mediante la elución con 10 ml de diclorometano. Las muestras eluidas se almacenaban a -18°C al menos durante 24 horas, para congelar el agua que contuviesen. Después las muestras se filtraban y se añadían 100 μl del patrón interno a la muestra filtrada. Finalmente, se llegaba a un volumen de 0.5 ml mediante evaporación bajo flujo de nitrógeno.

VI.2.4. Instrumentación.

Se inyectaban 2 μl del extracto en modo splitless (tiempo de splitless de 0.60 min) en un cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace GC (San Jose, CA, EE.UU.) equipado con un detector de masas selectivo Thermo Finnigan Trace DSQ, un inyector microsellado MERLIN y una columna capilar de sílice fundida Stabilwax (Restek, Bellefonte, PA, EE.UU.; 30 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de anchura), bajo las siguientes condiciones de trabajo: helio como gas portador a un flujo de 1.0 ml/min, 62 kPa; programa de temperatura de la columna, 35°C y calentamiento a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 100°C , posteriormente calentamiento a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 240°C (mantenido durante diez minutos). La temperatura de inyección fue de 250°C . La detección se llevó a cabo mediante impacto electrónico (EI) en modo “full scan”, empleando una energía de ionización de 70 eV y una temperatura en la línea de transferencia de 220°C . El rango de adquisición de masas fue de 30-400 uma.

La identificación de los picos se llevó a cabo empleando las librerías NIST 2.0 y Wiley 7.0, mediante comparación de los espectros de masas y confirmación mediante el tiempo de retención de los patrones. Los datos cuantitativos para los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa de los picos de los iones cuantificadores en relación al del patrón interno (2-octanol).

VI.2.5. Diseño experimental.

Para el tratamiento estadístico de los datos se empleó el programa informático “Statsgraphics Plus 5.1”.

En este estudio, se llevó a cabo una exploración secuencial de la respuesta en dos etapas. En la primera etapa, se estudió la influencia relativa de los factores y sus interacciones para el área cromatográfica total obtenida. Se seleccionaron cuatro factores que potencialmente podían afectar a la SPE: cantidad de muestra, volumen de eluyente, volumen de agua de lavado y dilución de la muestra.

Teniendo esto en consideración, se eligió un diseño factorial 2^{4+1} , que constaba de ocho experimentos, por duplicado, llevados a cabo en orden aleatorio para evitar el efecto de las variables lurking. Los valores correspondientes a los puntos alto (+), y bajo (–) para cada factor, elegidos en base a experimentos previos y datos bibliográficos, se muestran en la tabla VI.1.

En la segunda etapa, este diseño factorial de dos niveles se expandió a un diseño estrella. Se obtuvo un diseño central compuesto (CCD, con $\alpha = 1.287$), ya que los centros de los dos diseños por separado coincidían. La tabla VI.1 enumera los valores asignados para cada factor.

Tabla VI.1. Niveles de los factores para la optimización de las condiciones de extracción.

Factor	Bajo (-)	Alto (+)	Centro	Axial (- α)	Axial (+ α)
Cantidad de muestra (g)	2	7	4.5	1.28	7.73
Volumen de eluyente (ml)	10	50			
Volumen de agua de lavado (ml)	5	30	17.5	1.41	33.59
Dilución de la muestra	4	8	6	3.43	8.57

VI.3. Resultados y discusión.

VI.3.1. Selección del cartucho.

Antes del diseño factorial, se llevó a cabo un estudio preliminar para decidir qué cartucho podía ser el más adecuado.

El punto de partida fue un método de SPE para vinagre balsámico tradicional [10] donde se usaban cartuchos C18 y diclorometano como eluyente. Aunque no estaba validado, el método parecía ser adecuado para estas muestras tan complejas.

Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado nuevos materiales de empaquetado de cartuchos de SPE, donde la sílice ha sido sustituida por resinas poliméricas, ofreciendo una selectividad versátil y prometedora. En particular, las resinas LiChrolut-EN se han empleado de forma satisfactoria en el análisis de vino para la extracción de un amplio número de compuestos volátiles [19-21].

En base a en estas consideraciones, se probaron tres tipos de cartuchos comerciales de SPE: LiChrolut-EN, C18-1g, C18-2g. Se emplearon unas condiciones medias tales como 5 g de muestra (diluida 1:5), 15 ml de agua para el paso del lavado y 20 ml de eluyente para los cartuchos EN y C18-1g, mientras que para el cartucho C18-2g se emplearon valores dobles de estas condiciones con el fin de mantener la misma proporción de muestra/absorbente. Los cartuchos LiChrolut-EN y C18-2g mostraron aproximadamente los mismos resultados en términos de áreas cromatográficas totales, pero teniendo en cuenta la mayor cantidad de muestra requerida y, por tanto, el mayor tiempo de extracción necesitado para los cartuchos C18-2g, se seleccionaron finalmente los cartuchos EN.

VI.3.2. Optimización de las condiciones de extracción.

Se evaluaron la cantidad de muestra, el volumen de eluyente, el volumen de agua de lavado y la dilución de la muestra para conseguir las mejores condiciones analíticas globales. Dado que el objetivo del trabajo era desarrollar un método de extracción que cubriera el mayor número posible de compuestos, se empleó el área cromatográfica relativa total como respuesta experimental para la optimización.

VI.3.2.1. Barrido mediante un diseño factorial 2^{4-1} .

El diseño inicial de barrido detecta qué variables tienen la mayor influencia en la respuesta experimental. Los datos obtenidos se evaluaron mediante ANOVA a un nivel de significación del 5%. Los resultados se muestran en el diagrama de barras con los efectos ordenados en orden de importancia (figura VI.1).

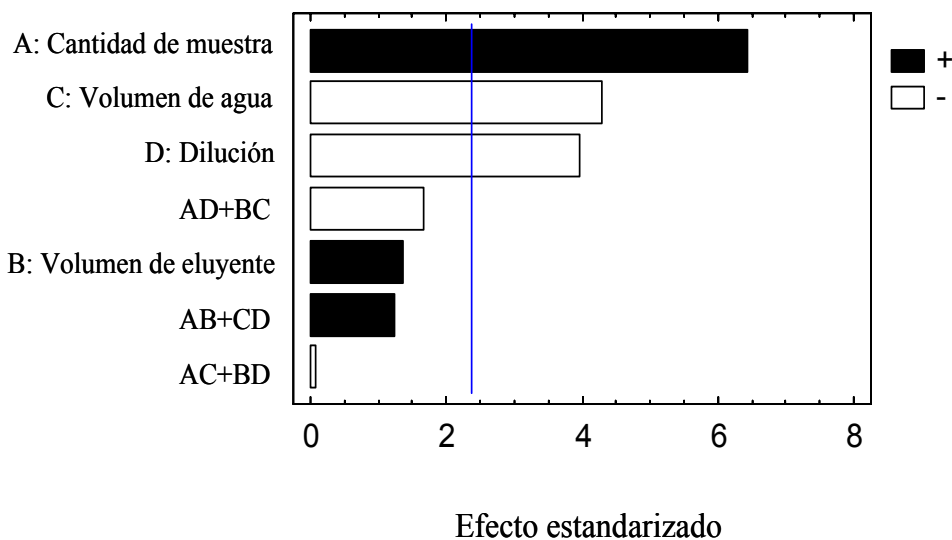


Figura VI.1. Diagrama de Pareto de los principales efectos en el diseño factorial 2^{4-1} para los compuestos volátiles estudiados. La línea representa el nivel de significación.

VI.3.2.2. Optimización mediante un diseño central compuesto.

Dado que el volumen de eluyente no presentaba un efecto significativo, no se consideró en el estudio. Se fijó en 10 ml, el mínimo valor empleado en el diseño previo, para minimizar el uso de disolventes medioambientalmente tóxicos y para asegurar tiempos de extracción cortos.

Por lo tanto, en el diseño central compuesto se estudiaron tres parámetros: cantidad de muestra, volumen de agua de lavado y dilución de la muestra. Los valores axiales para estos parámetros se localizan en una esfera rodeando el diseño factorial de dos niveles (tabla VI.2).

Como se esperaba a partir de los resultados obtenidos en los experimentos de barrido, de acuerdo con el diseño central compuesto la

variable más influyente fue la cantidad de muestra, con signo positivo (tabla VI.2). El volumen de lavado también fue significativo y con un signo negativo, siendo un resultado predecible. Antes de llevar a cabo el diseño experimental, se estudió la posibilidad de no emplear agua de lavado con varias experiencias, pero se encontraron algunos problemas significativos. La gran cantidad de ácido acético que permanecía en el extracto cambiaba el comportamiento de separación de los cartuchos y evitaba una correcta integración de los picos que salían entre los minutos 19.0 y 21.5 (incluyendo al patrón interno). Para evitar estos problemas, se concluyó que era obligado utilizar una mínima cantidad de agua y este parámetro se incluyó en el diseño de experimentos. Aunque la dilución de la muestra no fue estadísticamente significativa, existía una interacción entre los factores volumen de lavado y dilución, teniendo en cuenta los p -valores y las relaciones- F del análisis ANOVA (tabla VI.2).

Tabla VI.2. Principales efectos y sus interacciones en el diseño central compuesto.

Efecto	Relación F	p -valor	Signo
A: Cantidad de muestra	68.12	0.0000 ^A	+
B: Volumen de agua de lavado	7.88	0.0106 ^A	-
C: Dilución de la muestra	3.00	0.0982	-
AA	0.35	0.5604	+
AB	3.96	0.0598	+
AC	0.26	0.6180	+
BB	9.61	0.0054 ^A	+
BC	5.17	0.0335 ^A	+
CC	0.12	0.7340	-

Los valores^A son significativos para $p < 0.05$

La figura VI.2 muestra la superficie de respuesta obtenida al representar el volumen de muestra frente a la dilución de la muestra. Se puede observar que cuando se emplean pequeñas cantidades de agua de lavado, diluciones menores proporcionan mayores eficiencias de extracción.

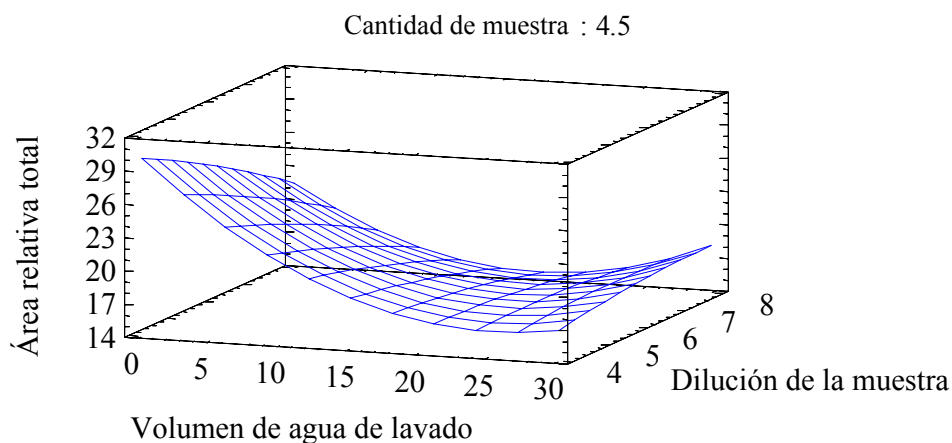


Figura VI.2. Superficie de respuesta obtenida empleando el diseño central compuesto al representar volumen de agua de lavado frente a dilución de la muestra.

Después de considerar todo los factores principales y sus interacciones, las mejores condiciones para la extracción de compuestos volátiles en vinagres balsámicos tradicionales son:

- ✓ Cantidad de muestra: 7 g
- ✓ Volumen de agua de lavado: 5 ml
- ✓ Dilución de la muestra: 1:4
- ✓ Volumen de eluyente: 10 ml

Estas condiciones, por tanto, representan un compromiso óptimo entre las eficiencias de extracción, tiempo de elución del cartucho de SPE,

volúmenes reducidos de disolvente orgánico y un coste razonable en términos de cantidad de muestra necesaria para el análisis (considerando que el precio comercial del vinagre balsámico tradicional oscila entre 80 y 120 euros/100 ml).

VI.3.3. Características analíticas.

Se estudiaron un total de 21 compuestos, que cubrían las diferentes familias químicas. Para elegir los compuestos representativos para cada clase química (tabla VI.3) se tuvieron en consideración los datos publicados sobre la composición volátil del vinagre balsámico tradicional [10-13].

VI.3.3.1. Calibración. Linealidad.

Se estudiaron cinco niveles de concentración por triplicado; estas concentraciones cubrían los rangos de concentración esperados para estos compuestos en vinagres balsámicos tradicionales.

Se emplearon uno o dos iones mayoritarios para calcular la relación de áreas de pico [compuesto volátil/patrón interno] para cada compuesto volátil estudiado (tabla VI.3). Los coeficientes de correlación fueron buenos ($r^2 > 0.99$) para todos los compuestos estudiados. Para corroborar los excelentes valores de linealidad obtenidos, se calculó la “linealidad on-line (LOL) = 100 – RDS(b)” para cada compuesto, con valores superiores al 96%. La RSD(b) es la desviación estándar relativa de la pendiente expresado como porcentaje. Todas las características de las curvas de calibrado aparecen en la tabla VI.3.

Tabla VI.3. Características de las curvas de calibrado.

Compuesto	Iones empleados (m/z)	Rango estudiado ($\mu\text{g/l}$)	r^2	Linealidad (LOL, %)	Pendiente \pm D.E.	Ord. Orig. \pm D.E.
Alcohol isoamílico	55, 70	72.45-3622.86	0.9995	98.87	0.0075 \pm 0.0001	0.0036 \pm 0.0009
3-Hidroxi-2-butanona*	43, 45	0.36-18.06	0.9989	98.66	0.0137 \pm 0.0002	0.0470 \pm 0.0118
Lactato de etilo	45	37.02-1851.43	0.9988	98.60	0.0162 \pm 0.0002	0.0047 \pm 0.0015
3-Etoxi-1-propanol	59, 71	69.48-3474.27	0.9991	98.74	0.0052 \pm 0.0001	0.0026 \pm 0.0008
Furfural*	95, 96	3.57-357.51	0.9940	96.53	0.0075 \pm 0.0003	0.4469 \pm 0.2757
Benzaldehído	105, 106	3.53-176.79	0.9996	99.15	0.0578 \pm 0.0005	0.0011 \pm 0.0003
γ -Butirolactona*	42, 86	0.71-35.74	0.9998	99.29	0.0048 \pm 3 \times 10 ⁻⁵	0.0134 \pm 0.0033
Ácido isovalérico *	60	1.42-71.36	0.9958	97.36	0.0055 \pm 0.0001	0.1445 \pm 0.0374
Succinato de dietilo	101, 129	0.60-7438.57	0.9964	97.89	0.0247 \pm 0.0005	0.0136 \pm 0.0125
2-Fenilacetato de etilo	164	3.42-341.64	0.9976	97.17	0.0033 \pm 0.0001	0.0002 \pm 0.0001
Guaiacol	109, 124	8.43-842.86	0.9999	99.40	0.0334 \pm 0.0002	- 0.0002 \pm 0.0003
Alcohol bencílico	79, 108	44.23-4422.86	0.9972	98.01	0.0196 \pm 0.0004	0.0082 \pm 0.0050
2-Feniletanol*	91, 122	1.44-72.15	0.9976	98.01	0.0128 \pm 0.0002	0.3661 \pm 0.0658
Whiskeylactona	99	12.29-1228.57	0.9971	97.79	0.0117 \pm 0.0003	0.0011 \pm 0.0009
Maltol	126	70.46-7045.71	0.9985	98.54	0.0123 \pm 0.0002	- 0.0009 \pm 0.0036
Eugenol	164	6.6-660	0.9999	99.41	0.0163 \pm 0.0001	- 0.0001 \pm 0.0001
4-Etilfenol	107, 122	14.63-1462.86	0.9994	99.07	0.0437 \pm 0.0004	- 0.0002 \pm 0.0017
Siringol	139, 154	3.62-7257.14	0.9998	99.41	0.0216 \pm 0.0001	- 0.0020 \pm 0.0024
5-Hidroximetil-2-furaldehído*	97, 126	15.30-1529.71	0.9956	96.15	0.0012 \pm 4 \times 10 ⁻⁵	0.2879 \pm 0.2436
Ácido fenilacético*	91, 136	0.07-7.18	0.9973	97.88	0.0166 \pm 0.0003	- 0.0146 \pm 0.0070
Ácido hexadecanoico	73, 129	69.48-3474.29	0.9994	98.62	0.0013 \pm 2 \times 10 ⁻⁵	0.0015 \pm 0.0002

* mg/l

VI.3.3.2. Límites de detección y cuantificación.

Para determinar los límites de detección y cuantificación a partir de las curvas de calibrado de cada compuesto volátil se empleó el programa informático Alamin [22]. Los límites de detección y cuantificación obtenidos (tabla VI.4) fueron lo suficientemente bajos para determinar estos compuestos en las muestras de vinagre balsámico tradicional de acuerdo con los valores encontrados para ellos en la bibliografía [10]

VI.3.3.3. Precisión. Recuperación, repetibilidad y reproducibilidad.

Para calcular la precisión del método, se llevó a cabo un estudio de recuperación. Se añadieron concentraciones conocidas de los compuestos volátiles a una muestra y se determinaron las concentraciones antes y después de la adición. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se calculó el porcentaje de recuperación para cada compuesto estudiado en base a estas concentraciones (tabla VI.4). La mayoría de los compuestos presentaban valores de recuperación razonablemente altos (mayores que el 75%). Algunos compuestos como el ácido hexadecanoico, ácido fenilacético, 3-hidroxi-2-butanona, γ -butirolactona y 3-etoxi-1-propanol presentaron valores de recuperación menores (<50%). Considerando la alta solubilidad de estos compuestos en agua, el paso de lavado pudo afectar negativamente a sus valores de recuperación; sin embargo, es un paso esencial porque era imperativo reducir la cantidad de ácido acético de las muestras.

Tabla VI.4. Características analíticas.

Compuesto	Límite de detección (LOD, µg/l)	Límite de cuantificación (LOQ, µg/l)	Recuperación (%)	Repet. (RSD, %)	Reprod. (RSD, %)
Alcohol isoamílico	20.18	67.25	-	8.32	4.19
3-Hidroxi-2-butanona	35.65	118.83	<50	21.38	18.04
Lactato de etilo	12.71	42.36	73.37	6.46	2.27
3-Etoxi-1-propanol	19.53	65.11	<50	8.48	1.76
Furfural	53.03	176.77	113.73	1.55	2.96
Benzaldehído	1.05	3.52	104.97	8.65	5.55
γ-Butirolactona	168.04	560.13	<50	12.41	13.35
Ácido isovalérico	496.42	1654.72	114.91	2.67	0.50
Succinato de dietilo	4.13	13.77	85.10	6.73	8.57
2-Fenilacetato de etilo	1.71	5.71	73.50	7.10	7.71
Guaiacol	1.93	6.45	76.36	12.14	7.74
Alcohol bencílico	14.87	49.56	107.45	7.17	10.50
2-Feniletanol	125.93	419.78	118.68	7.97	7.54
Whiskeylactona	3.01	10.03	86.42	7.95	18.76
Maltol	15.56	51.86	89.53	19.71	18.73
Eugenol	1.21	4.02	82.17	11.20	25.63
4-Etilfenol	1.82	6.08	92.01	7.60	18.92
Siringol	0.35	1.17	61.07	21.75	21.41
5-Hidroximetil-2-furaldehído	791.06	2636.87	-	19.71	24.70
Ácido fenilacético	29.72	99.06	<50	21.80	23.67
Ácido hexadecanoico	20.95	69.85	<50	13.49	21.79

-: No estudiado; <50: Valor menor del 50% de recuperación

El nivel de concentración del alcohol isoamílico encontrado en la matriz empleada para el estudio estaba fuera de rango. Estos altos valores para este compuesto proceden de los vinagres de vino empleados en la elaboración del vinagre balsámico industrial [13], que formaba parte de la matriz, mientras que la calibración estaba enfocada a los niveles menores presentes en el vinagre balsámico tradicional. Por otra parte, el 5-hidroximetil-2-furaldehído presentaba picos cromatográficos saturados que no podían ser medidos con precisión. El error cometido en la medida produjo valores de recuperación extraños para este compuesto. Por estas razones, la recuperación del alcohol isoamílico y del 5-hidroximetil-2-furaldehído no fue estudiada.

La precisión intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad) del método se calcularon mediante cinco extracciones de la muestra realizadas al mismo tiempo y otras cinco realizadas en días diferentes. Como se puede observar en la tabla VI.4, las desviaciones estándares relativas (RSD) para la precisión intra-día oscilaban entre 1.55% y 21.80% (los valores mayores de RSD pertenecían a los compuestos con valores menores de recuperación) mientras que los valores de precisión inter-día se situaban entre 0.50% y 25.63%. Sin embargo, la mayoría de compuestos presentaban valores por debajo del 15% y valores altos de RSD, sobre todo en el estudio de reproducibilidad, también reflejado por otros autores [19].

En resumen, teniendo en cuenta la recuperación, repetibilidad y reproducibilidad, el método desarrollado alcanzaba un nivel aceptable de precisión para el estudio de los compuestos volátiles en vinagres balsámicos tradicionales.

VI.3.4 Determinación de compuestos volátiles en vinagre balsámico tradicional.

Se analizaron por triplicado dos vinagres balsámicos tradicionales con diferentes periodos de envejecimiento empleando el método previamente desarrollado. El VBT1 se corresponde con un vinagre balsámico tradicional con un mínimo de 12 años de envejecimiento, mientras que el VBT2 es un vinagre balsámico tradicional “extravecchio”, envejecido al menos durante 25 años. Los resultados medios se presentan en la tabla VI.5. En la figura VI.3 se observa el cromatograma de la muestra más envejecida (VBT2) con los tiempos de retención de todos los compuestos estudiados.

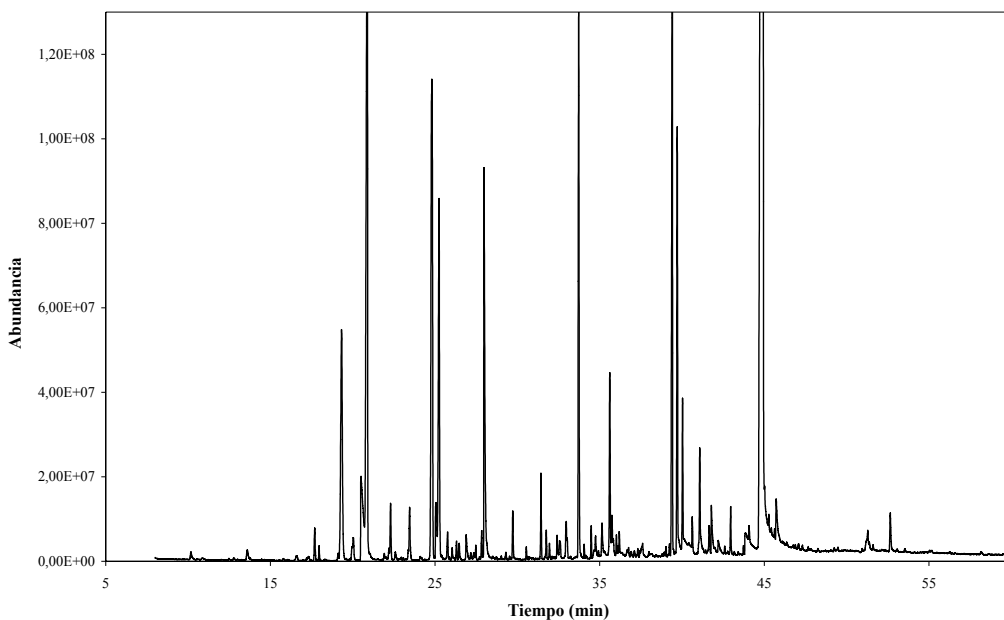


Figura VI.3. Cromatograma obtenido para la muestra VBT2 empleando el método SPE-GC-MS. Tiempos de retención (min): Alcohol isoamílico (10.79); 3-hidroxi-2-butanona (13.53); lactato de etilo (16.01); 3-etoxi-1-propanol (17.26); furfural (20.8); benzaldehído (22.8); γ -butirolactona (26.29); ácido isovalérico (27.96); succinato de dietilo (27.96); 2-fenilacetato de etilo (30.73); guaiacol (32.52); alcohol bencílico (32.94); 2-feniletanol (33.71); whiskeylactona (34.47); maltol (34.76); eugenol (38.77); 4-etilfenol (39.01); siringol (40.63); 5-hidroximetil-2-furaldehído (44.75); ácido fenilacético (45.74); ácido hexadecanoico (50.93).

Tabla VI.5. Concentración media de los compuestos volátiles estudiados ($\mu\text{g/l}$) encontrada en dos muestras reales de vinagre balsámico tradicional. Media de tres análisis.

Compuesto	VBT1	VBT2
Alcohol isoamílico	237.63	100.03
3-Hidroxi-2-butanona*	1.70	0.556
Lactato de etilo	126.05	<L.D.
3-Etoxi-1-propanol	390.69	218.41
Furfural*	75.24	90.22
Benzaldehído	10.42	12.15
γ -Butirolactona*	0.86	1.37
Ácido isovalérico*	35.50	24.93
Succinato de dietilo	21.37	<L.D.
2-Fenilacetato de etilo	24.02	<L.D.
Guaiacol	<L.D.	12.43
Alcohol bencílico	171.38	353.33
2-Feniletanol*	9.89	14.12
Whiskeylactona	70.78	1025.81
Maltol	446.28	791.35
Eugenol	8.13	23.49
4-Etilfenol	47.09	94.90
Siringol	19.96	25.71
5-Hidroximetil-2-furaldehído*	728.37	1456.47
Ácido fenilacético*	2.71	2.79
Ácido hexadecanoico	160.38	286.13

VBT1: Al menos con 12 años de envejecimiento.

VBT2: Al menos con 25 años de envejecimiento.

*: mg/l

<L.D.: Por debajo del límite de detección

Los compuestos presentes en una mayor concentración (en el orden de los mg/l) fueron la 3-hidroxi-2-butanona, furfural, γ -butirolactona, ácido isovalérico, 2-feniletanol, 5-hidroximetil-2-furaldehído y ácido fenilacético.

Los otros compuestos volátiles identificados en las muestras presentaron concentraciones del orden de los $\mu\text{g/l}$. Aunque la 3-hidroxi-2-butanona y el ácido isovalérico son compuestos mayoritarios del vinagre balsámico tradicional, se han encontrado concentraciones mayores en otros vinagres como el vinagre de Jerez [23]. Los compuestos furánicos como el furfural y el 5-hidroximetil-2-furaldehído se forman principalmente durante la etapa de cocción del mosto en el proceso de elaboración, como consecuencia de la degradación de los azúcares [7], pero sus concentraciones aumentan con el proceso de envejecimiento, como queda demostrado a la vista de los resultados experimentales. Otros compuestos derivados del proceso de extracción de la madera, como la whiskeylactona, el eugenol y el siringol, muestran un aumento en sus concentraciones al pasar de la muestra VBT1 a la muestra VBT2.

Por otra parte, la concentración de los ésteres etílicos, como el succinato de dietilo, disminuyen debido al desplazamiento en el equilibrio de esterificación, producido por la pequeña cantidad de etanol y probablemente también debido a la volatilización [10]. Las cantidades de alcoholes como el alcohol isoamílico y el 3-etoxi-1-propanol también disminuyen con el envejecimiento en el vinagre balsámico tradicional.

VI.4. Conclusiones.

Las condiciones para el análisis de los compuestos volátiles en vinagres balsámicos tradicionales mediante SPE-GC-MS se han optimizado empleando métodos estadísticos. Bajo las condiciones optimizadas en este estudio, la extracción en fase sólida se puede considerar una técnica apropiada para la extracción de este tipo de compuestos, en matrices con el nivel de complejidad del vinagre balsámico tradicional. Los límites de

detección y cuantificación y la precisión obtenidos son adecuados para la cuantificación de los compuestos estudiados.

A la vista de los resultados obtenidos, el método desarrollado puede ser usado para investigaciones posteriores relacionadas con la composición volátil del vinagre balsámico tradicional, aumentando el número de los compuestos estudiados, como se verá en el capítulo X.

VI.5. Bibliografía.

- [1] M. Cocchi, P. Lambertini, D. Manzini, A. Marchetti, A. Ulrichi, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5255.
- [2] M. Plessi, D. Bertelli, F. Miglietta, J. Food Compos. Anal. 19 (2006) 49.
- [3] F. Chinnici, F. Masino, A. Antonelli, J. Chromatogr. Sci. 41 (2003) 305.
- [4] L. De Vero, E. Gala, M. Gullo, L. Solieri, S. Landi, P. Giudici, Food Microbiol. 23 (2006) 809.
- [5] L. Solieri, S. Landi, L. De Vero, P. Giudici, J. Appl. Microbiol. 101(1) (2006) 63.
- [6] F. Corradini, L. Marcheselli, G. Franchini, A. Marchetti, C. Preti, C. Biancardi, J. AOAC Int. 77 (1994) 714.
- [7] A. Antonelli, F. Chinnici, F. Masino, Food Chem. 88 (2004) 63.
- [8] F. Masino, F. Chinnici, G.C. Franchini, A. Ulrichi, A. Antonelli, Food Chem. 92 (2005) 673.
- [9] F. Masino, F. Chinnici, A. Bendini, G. Montevecchi, A. Antonelli, Food Chem. 106 (2008) 90.
- [10] G. Zeppa, M. Giordano, V. Gerbi, G. Meglioli, Ital. J. Food Sci. 3(14) (2002) 247.
- [11] A. Del Signore, J. Food Eng. 50 (2001) 77.

- [12] M. Cocchi, C. Durante, M. Grandi, D. Manzini, A. Marchetti, *Talanta* 74 (2008) 547.
- [13] M. Cocchi, C. Durante, G. Foca, D. Manzini, A. Marchetti, A. Ulrici, *Chemometr. Intell. Lab. 71* (2004) 129.
- [14] M. Lee, S.Y. Oh, T.S. Pathak, I.R. Paeng, B.Y. Cho, K.J. Paeng, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 340.
- [15] E. Morgan, *Chemometrics: Experimental Design*, Wiley, Chichester, 1991, pág. 197.
- [16] R. G. Brereton, *Chemometric: Applications of mathematics and Statistics to Laboratory Systems*, Ellis Horwood, Chichester, 1990.
- [17] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104(1-2) (2006) 47.
- [18] E. Durán, R. Castro, R. Natera, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 144.
- [19] R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 167.
- [20] L. Cullerè, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferriera, *J. Chromatogr. A* 1017 (2003) 17.
- [21] M.J. Ibarz, V. Ferreira, P. Hernandez-Orte, N. Loscos, J. Cacho, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 217.
- [22] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J.L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [23] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 18.

APLICACIONES A LOS PROCESOS
DE ELABORACIÓN



VII SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE ACETIFICACIÓN DE UN VINAGRE DE JEREZ MEDIANTE SBSE-GC-MS E IR-MEDIO.

VII.1. Introducción.

La calidad de un vinagre va a estar condicionada por la materia prima de partida, el sistema de acetificación seguido y el envejecimiento en madera al que pueda estar sometido. Un paso clave en la producción de vinagre es la acetificación. Como ya se ha indicado en el primer capítulo, existen dos posibles formas para realizar la fermentación acética: fermentación en cultivo superficial y fermentación en cultivo sumergido. Aunque teóricamente, la calidad del vinagre final es mayor cuando se realiza mediante la técnica de cultivo superficial [1], presenta varios problemas y es bastante más lenta, por lo que últimamente esta técnica está siendo relegada en beneficio de la fermentación sumergida en el ámbito de la elaboración de vinagres a escala industrial [2].

El vinagre de vino se produce a escala industrial, principalmente, empleando un proceso semicontínuo donde se retira una fracción del volumen total producido [3, 4]. El volumen restante, que actúa como inóculo para el ciclo siguiente, se llena con el vino fresco que se agrega en varias porciones para obtener el volumen de trabajo final.

La fermentación se lleva a cabo en periodos de 24-48 horas donde se utilizan grandes cantidades de vino, como material de partida. Aunque el objetivo básico del proceso de la fermentación acética es la transformación de etanol en ácido acético mediante el metabolismo de bacterias acéticas, existen otros procesos químicos y bioquímicos que suceden en paralelo y que caracterizarán el producto final.

Por tanto, durante este proceso las propiedades del vinagre irán evolucionando. Según Morales y col. [5] la composición volátil del vinagre de Jerez se ve modificada durante el proceso de acetificación, mientras que la composición polifenólica permanece relativamente constante. Además tienen especial interés la formación y ruptura de enlaces de tipo éster, la generación de furfurales, la liberación o formación de enlaces con los alcoholes superiores presentes. Todos estos componentes contribuyen a las características finales de los vinagres producidos y, por tanto, su generación o eliminación debe ser controlada.

Dado, por tanto, que la fracción volátil, que marca en gran medida las características organolépticas del vinagre, se ve condicionada por el proceso de acetificación, se hace sumamente interesante el llevar a cabo un seguimiento completo del proceso con el objetivo de evaluar y mejorar la calidad final del producto en función de posibles variaciones de las condiciones de acetificación. Para ello, es fundamental disponer de técnicas analíticas de control que permitan en este caso, fijar la composición volátil del vinagre al tiempo que se monitoriza la evolución del proceso, la evolución en cuanto al grado acético alcanzado. Para la determinación de la composición volátil se pueden emplear métodos de determinación mediante cromatografía gaseosa [6, 7]; sin embargo, aunque estos métodos son rápidos, requieren más tiempo del que estaría disponible si hiciese falta aplicar alguna acción correctora.

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos para la determinación individual de los compuestos de interés en vino y bebidas relacionadas empleando la técnica de infrarrojo medio como sistema de medida, usando normalmente instrumentos basados en Transformada de Fourier [8-10].

El interés fundamental de esta metodología se encuentra en la rapidez del análisis, la ausencia de preparación de las muestras y la ausencia de generación de residuos al no emplear reactivos para las determinaciones. Estas características la hacen una técnica adecuada para desarrollar sistemas de vanguardia/retaguardia en el control de procesos productivos [11], de forma que se puedan arbitrar acciones correctoras en el menor tiempo posible.

Un proceso en donde es de vital importancia la aplicación de medidas correctivas es en la fermentación acética, en la producción de vinagre. Se han desarrollado métodos rápidos de tipo espectroscópicos para el control de este proceso a nivel industrial, en alguno de ellos tan sólo se determina on-line el consumo del etanol por las bacterias [12], en otros se ha empleado la técnica del infrarrojo cercano (near infrared, NIR) para el control simultáneo de etanol, ácido acético, acetato de etilo y acetoína [13]; de hecho, se ha demostrado que la técnica NIR es válida para la determinación de varios parámetros de interés en muestras de vinagre [14]. Sin embargo, la técnica de infrarrojo mediante transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR), una técnica cada vez más introducida en los laboratorios de las bodegas, no ha sido evaluada como sistema de control de producción de vinagres, no habiéndose encontrado datos en la bibliografía sobre este aspecto. Aunque sí ha demostrado su validez en el control de producción de otras bebidas relacionadas [15, 16].

Las técnicas analíticas empleadas para llevar a cabo el seguimiento de control han sido la SBSE, para el estudio de los compuestos volátiles, y la FT-IR, para suministrar a las empresas un sistema rápido de control de la calidad de elaboración. Ambas técnicas se han optimizado con anterioridad en el seno de nuestro grupo de investigación para el control de la fracción

aromática de vinos y vinagres [6, 7], así como para el control en el proceso de elaboración de vinos [16].

El objetivo de este trabajo es elaborar un método basado en la FT-IR para el seguimiento y control del proceso de acetificación industrial, determinando los compuestos que se generan o destruyen durante este proceso, además de los compuestos mayoritarios, ésteres, furfurales y alcoholes.

VII.2. Materiales y métodos.

VII.2.1. Condiciones de la fermentación.

El proceso de fermentación sobre el que se ha llevado a cabo el seguimiento ha sido de tipo cultivo sumergido, habiéndose realizado un total de cuatro muestreos en dos reactores de acero inoxidable de diferente tamaño, cilíndricos de fondo cóncavo. Dos fueron los procesos de acetificación estudiados sobre cada fermentador, partiendo en cada caso de un vino blanco procedente de la variedad palomino fino que fue sometido a las mismas condiciones de fermentación. Se decidió realizar los muestreos en dos diferentes épocas del año, puesto que los vinos originales tendrían diferentes grados de envejecimiento, y esto podría afectar a la evolución de los procesos de esterificación del etanol o del ácido acético.

Al inicio del proceso, el fermentador presenta ya una carga de vinagre a la que se le añade el vino de partida. El proceso se veía sometido a un sistema de aireación desde la parte inferior con la doble finalidad de producir la perfecta homogeneización del medio y de proporcionar a las bacterias el oxígeno necesario para la realización de la fermentación acética. Ambos fermentadores fueron muestreados periódicamente desde la carga

completa de los mismos hasta completar el ciclo de acetificación (acidez de al menos 9 grados acéticos, en unas 12 horas para el depósito pequeño (P) y 20 para el depósito grande (G)). Todas las características referentes a los fermentadores se muestran en la tabla VII.1.

A fin de prevenir la pérdida de volátiles se empleó un sistema refrigerador mediante camisa de agua fría, de tal forma que durante todo el proceso la temperatura se mantuvo en unos 32°C. En todos los procesos, se determinó la finalización de la acetificación cuando se alcanzaban 10.5 grados acéticos y un contenido de etanol menor del 1%.

Tabla VII.1. Principales características de los fermentadores.

Fermentador	Capacidad tanque (l)	Volumen final (l)	Carga inicial (l)	T ^a (°C)	Tiempo de Carga (h)	Caudal aire (m ³ /h)
G	33000	26000	20000	32	12	70
P	5000	3500	2500	32	2	7

VII.2.2. Métodos de análisis.

Los compuestos volátiles se determinaron mediante cromatografía de gases (Agilent modelo 6890 GC-5973N MS) acoplada a un detector de masas con sistema de inyección de muestra de extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE; unidad de desorción térmica TDS-2; Gerstel). Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo el análisis de volátiles fueron: para la extracción, agitación de las barras durante 2 h. a 1250 rpm en un volumen de muestra de 25 ml añadiendo NaCl (4 M); para la desorción, calentamiento de 40°C hasta 300°C manteniendo 10 min la temperatura máxima, usando una trampa criogénica a -140°C y un flujo de helio durante la inyección de 75ml/min. Las condiciones cromatográficas fueron las

siguientes: se usó una columna capilar DB-Wax (J&W Scientific), 60 m x 0.25 mm de diámetro interno, con un recubrimiento de 0.25 μm ; el flujo de helio usado fue de 1 ml/min. La temperatura del horno fue programada de la siguiente manera: temperatura inicial del horno 35°C durante 10 min, se elevó a continuación a razón de 5°C/min hasta 100°C, para elevar después a 3°C/min hasta 230°C y mantener durante 40 min. El detector de masas operó en modo EI+ a 70eV con un rango de 30 a 400 uma. Los análisis se realizaron por duplicado. La identificación de los picos se llevó a cabo usando la librería Wiley por analogía con los espectros de masas y fueron confirmados gracias a los índices de retención de los patrones cuando fue posible o con los datos de retención encontrados en la bibliografía. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa del ion molecular de cada compuesto, en relación a la del 4-metil-2-pentanol, el patrón interno.

El equipo de FT-IR empleado para la obtención de los espectros fue un MultiSpec (TDI, Barcelona, España). Se registraron los espectros entre los 900 y 3000 cm^{-1} . Las muestras fueron analizadas por duplicado y los espectros de cada análisis fueron obtenidos promediando un total de 26 espectros. Un espectro típico de FT-IR se muestra en la figura VII.1. Las muestras fueron filtradas a través de filtros de 0,45 micras previamente a su introducción en el equipo. La temperatura de trabajo estaba fijada en 25°C.

Los datos correspondientes a los distintos compuestos volátiles fueron sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) a fin de detectar las posibles diferencias existentes a lo largo de los distintos procesos seguidos de acetificación. Así mismo, aquellos compuestos que resultaron estadísticamente afectados por el proceso de acetificación fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA). Para ello se empleó el paquete de software Statgraphics plus 5.1 para Windows XP.

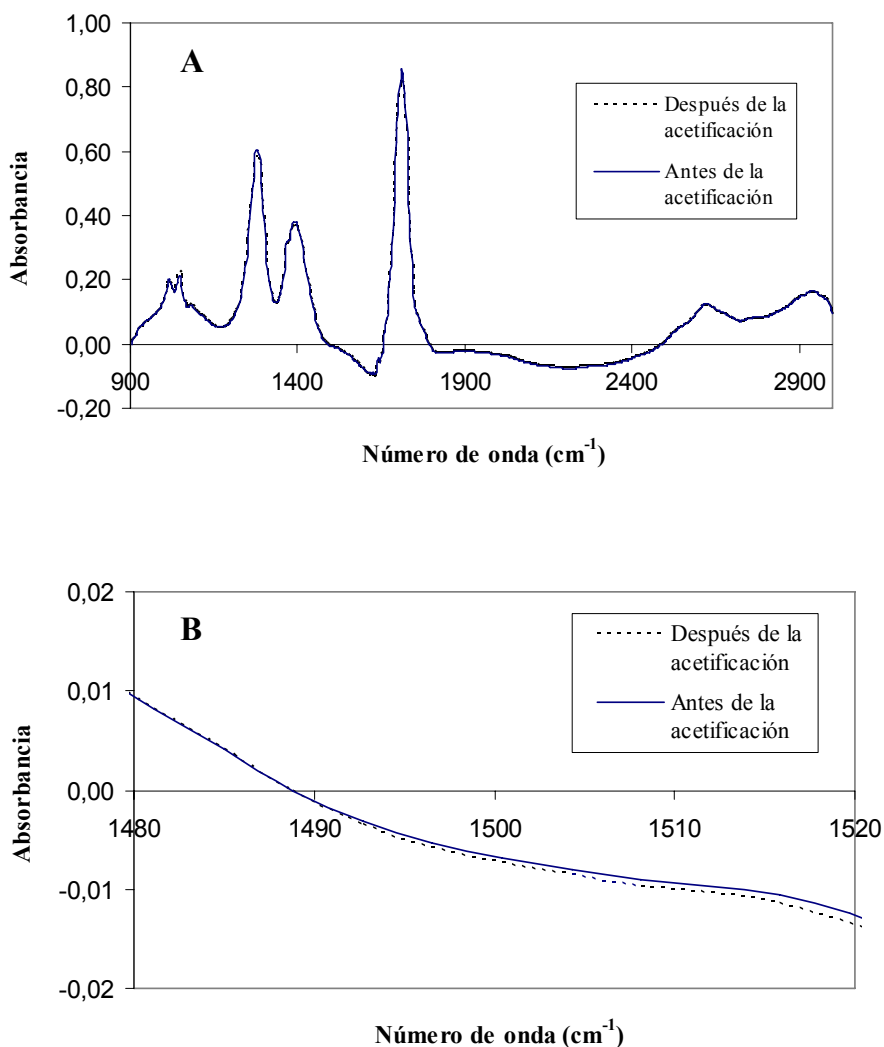


Figura VII.1. Espectros FT-IR de muestras del proceso de acetificación, desarrollado en el fermentador grande (26000 l). (A) Espectros FT-IR completos, antes y después de la acetificación (B) Zona ampliada de ambos espectros FT-IR.

Las calibraciones por PLS se realizaron empleando software Unscrambler versión 7.05 (Camo, Trondheim, Norway). Los datos empleados fueron las áreas de los picos cromatográficos corregidas por el área del patrón interno empleado en los análisis de SBSE-GC-MS.

VII.3. Resultados y discusión.

VII.3.1. Determinación de volátiles por SBSE-GC-MS.

Durante el proceso de acetificación se produce un cambio drástico en los componentes mayoritarios de la muestra, los niveles de ácido acético ascienden desde valores entre 0,4-1 g/L hasta 90-110 g/L, mientras que los valores de etanol descienden desde valores alrededor de 120 g/L hasta valores inferiores a 10 g/L.

La composición volátil estudiada mediante SBSE-GC-MS se incluye en la figura VII.2 para una muestra del inicio del proceso (tiempo=0 horas) y otra del final del proceso (tiempo=36 horas).

Los compuestos volátiles estudiados quedan recogidos en la tabla VII.2. En esta tabla se presentan los valores medios encontrados para el vinagre correspondiente al primer ensayo de acetificación en el fermentador de mayores dimensiones (1G) tras completar la carga (1G0) y una vez concluido el ciclo de acetificación (1G7). Junto a éstos aparecen los estadístico F y p correspondientes al análisis de la varianza al que se sometieron los valores encontrados para los diferentes compuestos estudiados.

Como podemos observar, de entre los compuestos volátiles estudiados, los que aparecen en mayor cantidad en el vinagre tras completar el proceso de acetificación son: 2-metil-1-butanol, isoamil alcohol, 3-hidroxi-2-butanona, lactato de etilo, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, succinato de dietilo, ácido hexanoico, alcohol bencílico, 2-feniletanol y ácido octanoico.

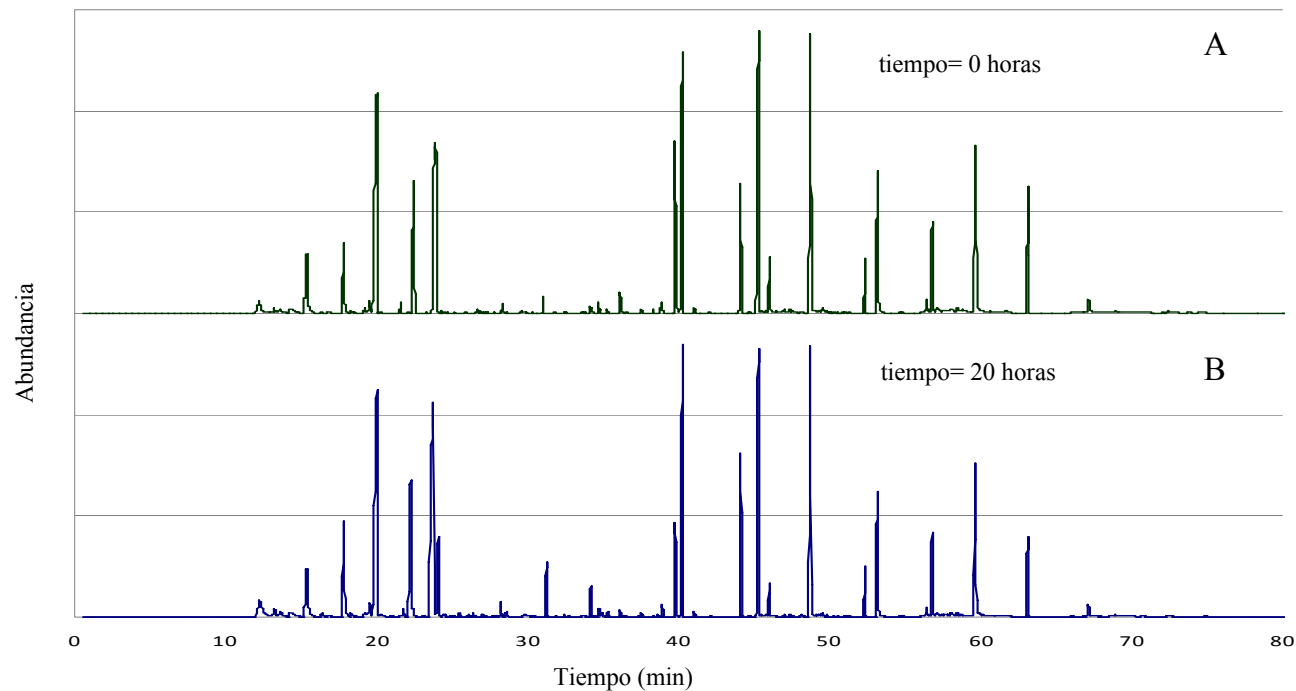


Figura VII.2. Cromatogramas obtenidos mediante SBSE para una muestra de vinagre del inicio (A) y del final (B) del proceso de acetificación. Compuestos volátiles identificados y tiempos de retención (min): isobutirato de etilo (13.62); acetato de propilo (13.99); acetato de isobutilo (15.76); butirato de etilo (16.84); acetato de n-butilo (18.38); isovalerato de etilo (18.46); hexanal (18.70); isobutanol (19.71); acetato de isoamilo (20.57); valerato de etilo (20.77); 1-butanol (21.84); trans-2-hexenal (24.01); alcohol isoamílico (23.84); 2-metil-1-butanol (24.12); caproato de etilo (24.65); acetato de hexilo (25.80); 3-hidroxi-2-butanona (26.62); acetato de cis-3-hexen-1-ol (27.59); lactato de etilo (28.51); hexan-1-ol (28.87); cis-3-hexen-1-ol (30.04); trans-2-hexen-1-ol (30.82); octanoato de etilo (31.87); 2-furaldehído (32.87); benzaldehído (35.15); ácido isobutírico (36.84); 5-metil-2-furaldehído (36.95); 2-acetil-5-metilfurano (38.54); ácido butírico (38.89); ácido isoaléxico (40.28); succinato de dietilo (40.58); α -terpineol (41.51); acetato de bencilo (42.64); 2-fenilacetato de etilo (44.59); acetato de 2-feniletilo (45.95); ácido hexanoico (46.57); alcohol bencílico (47.03); 2-feniletanol (49.21); ácido 2-etilhexanoico (50.17); 4-etilguaiacol (52.87); ácido octanoico (53.75); eugenol (57.21); 4-etilfenol (57.36); 5-acetoximetil-2-furaldehído (58.00); ácido decanoico (60.39); ftalato de dietilo (63.87); 5-hidroximetil-2-furaldehído (68.90).

Tabla VII.2. Concentraciones medias iniciales (1G0) y finales (1G7) ($\mu\text{g/l}$) del primer ensayo en depósito G. Resultados del ANOVA (nivel de significación $p < 0.05$).

Compuesto	1G0	1G7	F	p
Isobutirato etilo	13.31	10.86	1.71	0.2333
Acetato propilo	121.17	125.00	1.43	0.3137
Acetato isobutilo	82.53	130.11	2.75	0.0902
Butirato etilo	12.84	2.2	7.94	0.0045 ^a
Isopentanoato etilo	6.47	5.00	9.01	0.0030 ^a
Acetato n-butilo	2.2	1.9	6.07	0.0106 ^a
Hexanal	3.7	2.1	2.78	0.0808
Isobutanol*	12.65	17.99	3.00	0.0733
Acetato isopentilo	50.1	46.2	1.89	0.1958
Pentanoato etilo	-	-	-	-
1-Butanol	80.12	85.42	2.23	0.1417
<i>trans</i> -2-Hexenal	190.58	60.64	9.24	0.0027 ^a
2-Metil-1-butanol*	41.09	38.85	6.42	0.0169 ^a
Alcohol isoamílico*	27.33	23.37	5.55	0.0234 ^a
3-Hidroxi-2-butanona*	193.44	280.73	11.44	0.0011 ^a
Hexanoato etilo	15.11	7.30	10.34	0.0019 ^a
Acetato hexilo	0.53	0.46	3.67	0.0443 ^a
Acetato de <i>cis</i> 3-hexen-1-ol	0.16	0.10	6.33	0.0093 ^a
Lactato etilo*	26.65	35.79	8.10	0.0042 ^a
Hexan-1-ol	29.04	2.35	207.71	0.0000 ^a
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	77.39	65.62	1.01	0.4865
<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	37.2	35.1	2.21	0.1441
Octanoato Etilo	10.98	0.93	440.74	0.0000 ^a
2-Furaldehido	51.89	450.09	1.06	0.4639
Benzaldehido	9.15	3.95	13.03	0.0008 ^a
Ácido isobutírico*	44.34	93.30	49.54	0.0000 ^a
5-Metil-2-Furaldehido	-	-	-	-
2-Acetil-5-metilfuraldehido	-	-	-	-

* mg/l; ^a, $p < 0.05$.

Tabla VII.2 (continuación). Concentraciones medias iniciales (1G0) y finales (1G7) ($\mu\text{g/l}$) del primer ensayo en depósito G. Resultados del ANOVA (nivel de significación $p < 0.05$).

Compuesto	1G0	1G7	F	p
Ácido Butírico*	7.45	10.23	9.40	0.0026 ^a
Ácido isovalérico*	138.63	177.49	24.91	0.0001 ^a
Succinato dietilo*	1.18	1.13	1.46	0.3020
α -Terpineol	10.51	10.21	2.42	0.1192
Acetato bencilo	0.55	0.57	9.57	0.0024 ^a
2-Fenilacetato etilo	32.60	33.37	2.97	0.1111
Acetato 2-feniletilo	100.12	104.80	3.48	0.0877
Ácido hexanoico*	2.26	3.32	22.40	0.0001 ^a
Alcohol bencílico*	1.13	1.18	3.34	0.0561
2-Feniletanol*	17.38	17.95	2.23	0.1418
Ácido 2-Etil hexanoico	1.11	0.98	3.20	0.0511
4-Etilguaiacol	134.29	134.56	0.66	0.7026
Ácido octanoico*	2.29	2.79	2.97	0.1045
Eugenol	4.47	4.60	1.52	0.2842
4-Etilfenol	318.46	315.09	0.62	0.7266
5-Acetoximetil-2-furaldehido	-	-	-	-
Ácido decanoico	332.84	365.68	2.05	0.0589
Ftalato Dietilo	1.50	1.45	1.12	0.1110
5-Hidroximetil-2-Furaldehido	-	-	-	-

* mg/l; ^a, $p < 0.05$.

Así mismo, son varios los compuestos que muestran verse estadísticamente influenciados por el proceso de acetificación ($p < 0.05$). Entre estos destacan: butirato de etilo, isopentanoato de etilo, acetato de n-butilo, trans-2-hexenal, 2 y 3 metilbutanol, 3-hidroxi-2-butanona, hexanoato de etilo, acetato de hexilo, acetato cis-3-hexen-1-ol, lactato de etilo, hexan-1-ol, octanoato de etilo, benzaldehido, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido

isovalérico, acetato de bencilo, ácido hexanoico y ácido octanoico (tabla VII.2). Se obtuvieron resultados similares para los restantes ensayos de acetificación llevados a cabo en los dos fermentadores considerados.

Como se puede observar, son varios los compuestos de tipo alcohol que experimentan pérdidas que pueden ser explicadas vía metabolización de los mismos por las bacterias acéticas de forma similar al etanol [17]. Entre los ésteres destacan las pérdidas observadas para octanoato de etilo y butirato de etilo, mientras que lactato de etilo experimenta un claro incremento hacia finales del ciclo fermentativo. Acetoína (3-hidroxi-2-butanona) experimenta un importante incremento como consecuencia del proceso de acetificación [18], alcanzando valores comprendidos entre 300 y 1100 mg/l en los distintos vinagres obtenidos.

Se puede destacar también los incrementos encontrados para algunos ácidos tales como ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico y ácido hexanoico. Jones y Greenshields [19] encontraron incrementos similares para propiónico e isobutírico en vinagres obtenidos en un fermentador tipo Frings.

VII.3.2. Determinación de la evolución de los componentes aromáticos durante la acetificación.

Los datos correspondientes a los distintos compuestos volátiles considerados fueron sometidos a análisis de componentes principales (PCA). Esta herramienta permite investigar las posibles asociaciones existentes entre las variables medidas al tiempo que permite detectar los distintos grupos existentes entre las muestras consideradas. Para el primer proceso de acetificación a mayor escala (1G), se obtuvieron 7 componentes principales que explican el 93.20% de la variabilidad entre las distintas muestras. El

primer componente, que explica el 38.10% de esta variabilidad está constituido principalmente por ácido octanoico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico y benzaldehido; mientras que el segundo (20.31%) contiene principalmente 2-feniletanol, 2-fenilacetato de etilo, isobutirato de etilo y acetato de propilo, compuestos éstos que no han demostrado verse modificados por el proceso de acetificación.

En la figura VII.3 se presenta el diagrama de dispersión de las diferentes muestras correspondiente a este primer ensayo de acetificación a gran escala en el plano definido por los dos primeros componentes principales obtenidos en el PCA.

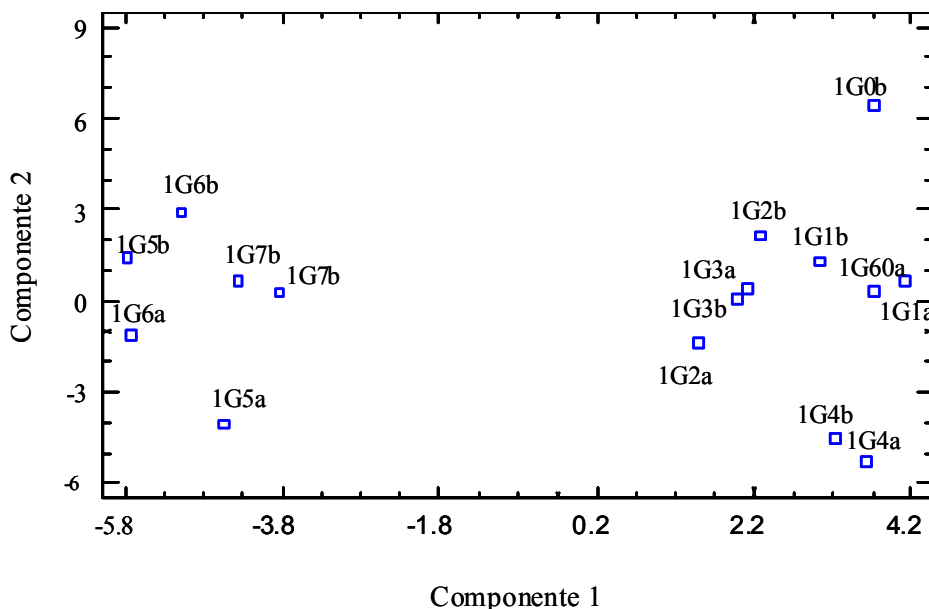


Figura VII.3. Diagrama de dispersión. PCA primer ensayo acetificación a gran escala. Datos: Compuestos volátiles.

Como se puede observar es el primer componente el que agrupa las muestras en dos claros grupos, uno correspondiente a inicios del proceso de acetificación (1G0-1G4) y otro correspondiente a finales de ciclo (1G5-1G7).

Durante el proceso de acetificación, el comportamiento de los compuestos de interés se encuentra relacionado con su estructura química, con lo que para obtener un mayor grado de fiabilidad en las correlaciones entre sus concentraciones y el espectro de infrarrojo, se realizaron agrupaciones de compuestos según su estructura química, de forma que se trabajó con la suma de las concentraciones de los siguientes grupos de compuestos: ésteres etílicos, alcoholes superiores, ácidos grasos, acetatos furfúricos. La evolución de los compuestos dentro de cada una de estas familias está condicionada por su estructura base más que por sus peculiaridades dentro de cada familia, por lo que una estimación de la concentración por familias puede ser un indicativo adecuado del desarrollo del proceso de acetificación.

En la figura VII.4 se presenta la evolución de los grupos de compuestos de mayor interés una vez se ha alcanzado el volumen total de vino a acetificar, momento a partir del cual no se produce adición alguna de vino al tanque. Los datos presentados corresponden a un proceso de acetificación desarrollado en un depósito de volumen grande (26000 l).

Puede verse como los ésteres etílicos presentan una rápida disminución al principio del proceso (primeros 90 minutos) para después permanecer casi constantes. El motivo debe ser la bajada del pH, junto con la desaparición del etanol del medio, que se traduce en una disminución de estos compuestos por el desplazamiento de los equilibrios entre las formas ésteres y los correspondientes ácidos y alcoholes libres.

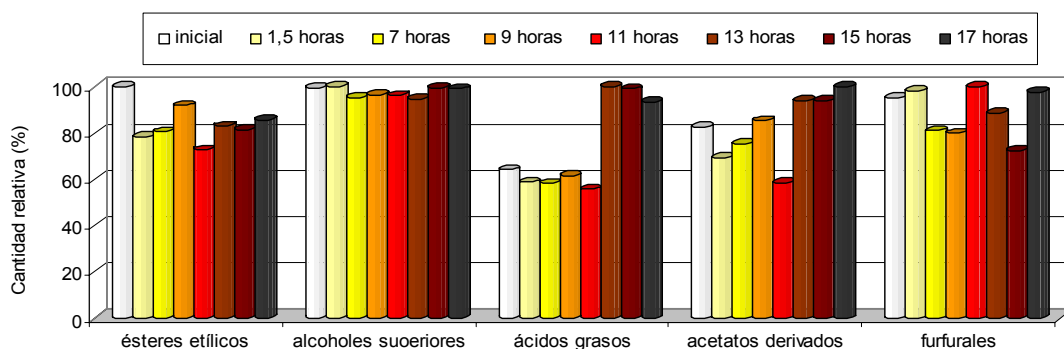


Figura VII.4. Evolución de los grupos de compuestos una vez que se ha alcanzado el volumen total de vino a acetificar. Los datos mostrados corresponden al proceso fermentativo realizado en el tanque de mayor tamaño (26000 l).

Los alcoholes superiores presentan una evolución distinta. Esta estabilidad en las concentraciones puede ser debida a la ausencia de reacciones de formación/rotura de ésteres de alcoholes superiores o bien a que las velocidades de formación/rotura sean similares, ya que la aparición del ácido acético debe llevar ineludiblemente a la aparición de acetatos de estos alcoholes.

Los ácidos grasos presentan una evolución completamente distinta a los anteriores parámetros; por un lado, muestran una alta estabilidad hasta la mitad del proceso, para después presentar un brusco aumento y luego una ligera disminución. Esta evolución puede ser debida a la acción de las bacterias.

Los ésteres derivados del ácido acético presentan un crecimiento continuo desde el comienzo del proceso, esta evolución es lógica y se explica por la formación de mayor cantidad de ésteres al incrementarse la cantidad presente de ácido acético.

Por último, la evolución de los compuestos de tipo furfural es completamente distinta a los anteriores. Sus valores permanecen oscilantes durante todo el proceso debido a la ausencia casi total de azúcares y a la falta de fenómenos de incrementos importantes de temperatura durante el proceso de acetificación, por lo que la generación de furfurales es muy limitada.

VII.3.3. Establecimiento de la correlación entre diferentes componentes aromáticos y el espectro de IR.

VII.3.3.1. Estudios previos.

A las mismas muestras comentadas se les determinaron los espectros de infrarrojo en el intervalo de 1000 cm^{-1} hasta 3000 cm^{-1} . Las zonas de absorción del agua fueron eliminadas del tratamiento de datos, que consistió en un análisis de agrupaciones y en un análisis de componentes principales, como técnicas exploratorias. Tras un primer análisis exploratorio, se eligieron diversas zonas del espectro en función de su importancia en las señales observadas.

El resultado del análisis de agrupaciones empleando la zona del espectro entre 2600 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} se muestra en la figura VII.5 para las muestras correspondientes al primer proceso analizado reactor más grande.

Como puede observarse, las muestras que presentan una mayor similitud son la 1G0 y la 1G1, que se corresponden con las muestras iniciales. Las muestras correspondientes a un desarrollo intermedio del proceso de acetificación (muestras 1G3, 1G4 y 1G5) forman un grupo diferenciado. Mientras que las muestras finales del proceso (1G6 y 1G7) forman otro grupo diferenciado, que a su vez muestra una mayor similitud con el vinagre considerado como objetivo del proceso (1G-Ref, muestra

tomada una vez que el proceso ha finalizado) que con las muestras del propio proceso de acetificación. Es decir, con esta zona del espectro infrarrojo se puede establecer una graduación de las muestras en función del desarrollo del proceso de acetificación.

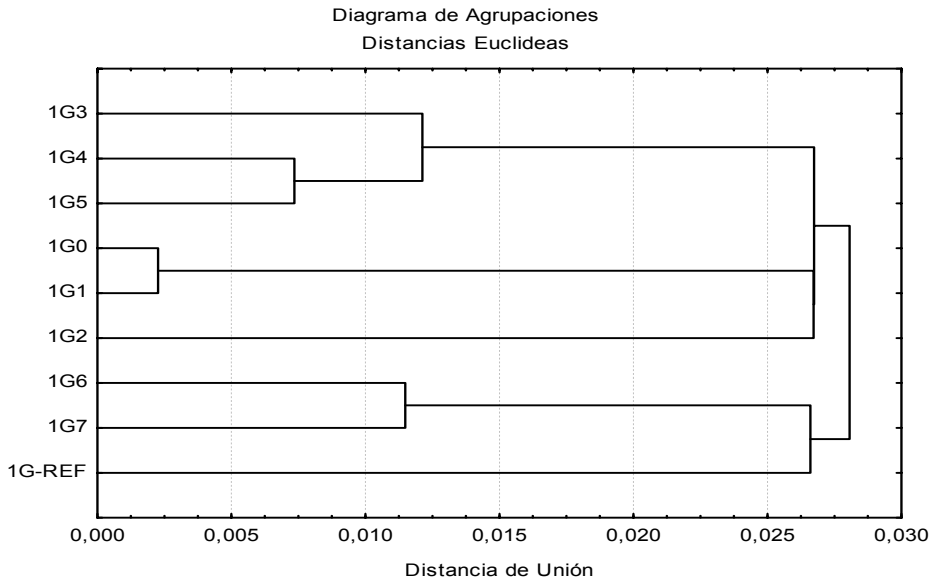


Figura VII.5. Resultado del análisis de agrupaciones de las muestras del primer ensayo acetificación a gran escala.

Con el objetivo de obtener una cuantificación numérica de la graduación obtenida, se realizó un análisis de componentes principales sobre las mismas muestras, mostrándose el resultado en la figura VII.6.

Como puede observarse, el componente principal 1 es donde se refleja la evolución de las muestras desde el punto inicial del proceso (1G0) hasta el punto final (1G7). Este componente es, además, el que recoge una mayor variabilidad del conjunto de muestras (75,79%). Es también muy importante la posición que en esta distribución ocupa la muestra considerada

como producto objetivo (1G-Ref), justamente en el punto adonde tiende la distribución de las muestras analizadas durante el proceso.

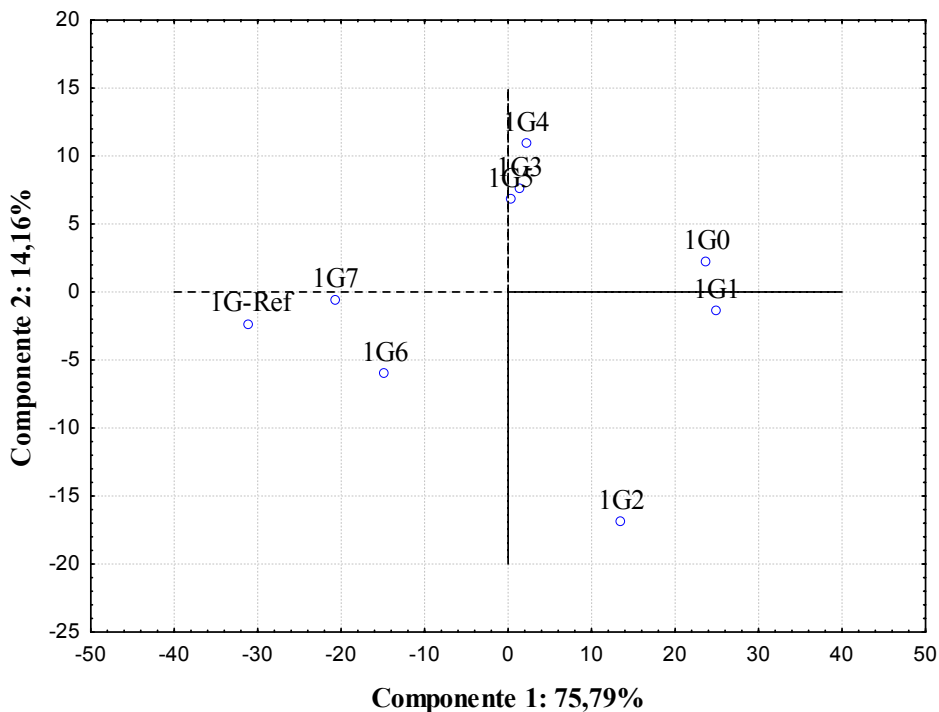


Figura VII.6. Diagrama de dispersión. PCA primer ensayo acetificación a gran escala. Datos: FT-IR

VII.3.3.2. Estudio de correlación.

A la vista de los resultados obtenidos, se realizó un estudio cuantitativo de la correlación entre los datos de volátiles y el espectro infrarrojo.

De una de las muestras correspondientes a un nivel medio de acetificación (7 horas tras el llenado del depósito), se realizaron 18 espectros en 3 días diferentes y se determinaron las desviaciones estándar de la señal a

cada valor de cm^{-1} , eliminándose del tratamiento posterior todas las zonas del espectro que alcanzaran valores de RSD superiores al 1% en estas medidas. Estas zonas fueron las comprendidas entre 1000 y 1052 cm^{-1} y entre 1214 y 1260 cm^{-1} . Tampoco se tuvieron en cuenta las zonas de absorción del agua, concretamente entre los 1600 y 1780 cm^{-1} . Se realizaron los espectros de FTIR de las muestras, desarrollándose el tratamiento de datos con los valores no eliminados en el proceso anterior.

Al disponer de un total de cuatro muestreos (52 muestras en total) se decidió realizar una división aleatoria de las muestras para llevar a cabo la calibración y la posterior validación del método. Se emplearon 39 muestras para el desarrollo de la calibración y 13 para el desarrollo de la validación. En el grupo de 13 muestras se encontraban al menos 2 muestras de cada uno de los muestreos realizados. En la tabla VII.3 se muestran los intervalos de variación encontrados para cada parámetro a estudiar en cada uno de los cuatro procesos de acetificación estudiados.

Se aplicó la calibración mediante PLS entre los valores de cada uno de los grupos de compuestos especificados en el apartado anterior y los valores de absorbancia a cada frecuencia del espectro. Los resultados obtenidos empleando el espectro completo se muestran en la tabla VII.4.

A la vista de los resultados de la calibración por PLS, es factible obtener una buena correlación entre los espectros de infrarrojo medio y los resultados del análisis de GC durante la evolución del proceso de acetificación. Este hecho es especialmente destacable en el de los acetatos y de los ésteres etílicos, puesto que a pesar de las grandes variaciones que presentan el ácido acético y el etanol, el espectro de IR-Medio recoge zonas de absorción donde pueden detectarse de forma selectiva las señales

correspondientes a los ésteres comentados, sin interferencias aparentes debidas a estos compuestos mayoritarios.

Tabla VII.3. Valores mínimos y máximos ($\mu\text{g/l}$) de cada parámetro en los diferentes muestreos de los procesos de acetificación estudiados. Determinaciones realizadas mediante SBSE-GC-MS.

		Ésteres etílicos	Alcoholes superiores	Ácidos grasos	Acetatos derivados	Furfurales
m1	Min	84,1	68796	169566	115,5	<LQ
	Max	159,8	81704	304325	247,2	635,7
m2	Min	46,0	85461	269495	29,1	<LQ
	Max	358,0	118625	492482	230,3	254,0
m3	Min	230,2	96182	40394	268,7	<LQ
	Max	459,9	170644	324984	1268,5	1325,8
m4	Min	55,7	38916	91343	278,8	<LQ
	Max	425,9	111192	292055	895,1	3205,9

<LQ: por debajo del límite de cuantificación

Tabla VII.4. Resultados de la calibración por PLS para cada uno de los grupos de compuestos

Parámetros	Ordenada en el origen ^a	Pendiente de la recta ^b	RMSEC	SEC	Zonas del espectro con mayor grado de participación (cm^{-1})
Ésteres etílicos	1.536	0.987	0.23	0.24	1438-1550
Alcoholes superiores	-548	0.999	11	12	1076-1585
Ácidos grasos	94	0.999	915	953	1349-1550
Acetatos derivados	0.002	0.999	0.13	0.14	1801-2788
Furfurales	0.001	0.999	0.35	0.36	1824-2858

^{a,b} Ordenada en el origen y pendiente de la recta de validación de la calibración

Con respecto a esas zonas concretas, hay que comentar que en el caso de los ésteres etílicos la zona de importancia dentro del espectro es relativamente estrecha ($1438-1550\text{ cm}^{-1}$), mientras que para los ésteres del ácido acético es sustancialmente más ancha, abarcando desde 1800 hasta 2788 cm^{-1} . En el caso de los compuestos con grupos funcionales hidroxilos o ácidos por separado, la zona del espectro de importancia para obtener la correlación es sustancialmente más amplia, abarcando casi la primera mitad del espectro analizado ($1076-1585\text{ cm}^{-1}$) para alcoholes superiores y la última parte del espectro ($1800-2800\text{ cm}^{-1}$) para ácido grasos y furfurales. Por este motivo, las probabilidades de encontrar un método selectivo que permita la estimación de los ésteres etílicos empleando el sistema de FT-IR son más bajas que en el caso de acetatos, alcoholes y ácidos, puesto que para estos últimos se tiene un mayor número de posibilidades de seleccionar frecuencias útiles. Sin embargo, estas mayores zonas del espectro con contribución a la calibración PLS también pueden significar un mayor grado de solapamiento de señales.

Con el fin de validar el modelo desarrollado, éste se aplicó sobre los espectros correspondientes a las muestras no utilizadas en el desarrollo de la calibración (13 muestras). Se determinaron los errores medios en la estimación de los valores de los diferentes parámetros, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla VII.5. En primer lugar hay que destacar que los errores de predicción empleando el espectro completo son altos para los derivados del ácido acético y para los furfurales. Para los otros grupos de compuestos, el empleo del espectro completo produce resultados con errores aceptables, especialmente en el caso de ésteres etílicos y alcoholes superiores.

Tabla VII.5. Errores en la predicción en la validación del modelo de PLS desarrollado empleando la totalidad del espectro de IR recogido y zonas específicas del espectro.

	Error medio de la predicción (%)		Rangos del espectro seleccionados
	Espectro IR total	Rangos específicos del espectro IR	
Ésteres etílicos	8.9	8.1	1438-1550
Alcoholes superiores	13.5	8.9	1076-1585
Ácidos grasos	23.3	18.4	1349-1550
Acetatos derivados	60.0	23.4	1600-1800
Furfurales	115.3	30.6	1800-2500

En el caso de las calibraciones desarrolladas empleando zonas específicas del espectro, los resultados fueron mejores. Las zonas del espectro a emplear se seleccionaron en base a los resultados obtenidos en el PLS mostrado en la tabla VII.4. Para aquellos parámetros que presentaban unas zonas del espectro muy amplias (derivados del ácido acético y furfurales), se desarrollaron calibraciones por zonas, intentando delimitar zonas más específicas, seleccionándose las que produjeron menores errores en la validación.

Puede comprobarse cómo las calibraciones desarrolladas empleando zonas determinadas permiten una estimación de los valores de los parámetros con unos errores menores que al emplear el espectro completo, salvo en los casos de ésteres etílicos y de alcoholes superiores, donde las diferencias son mínimas. Para los otros parámetros, las reducciones en las zonas del espectro resultan necesarias a la vista de la disminución de los errores de validación. Así, en el caso de furfurales y derivados del ácido

acético, los errores pasan de valores entre el 60 y el 115% a valores en el intervalo entre el 23 y el 30%.

VII.4. Conclusiones.

Tras los resultados obtenidos se puede concluir que son varios los compuestos volátiles que se ven modificados durante el proceso de acetificación, experimentando algunos de ellos importantes pérdidas mientras otros ven incrementadas sus concentraciones. Entre estos últimos encontramos ácidos como isobutírico, butírico e isovalérico.

En lo referente a la posibilidad de control en línea del proceso mediante la técnica de FT-IR, se concluye que es viable, puesto que esta técnica permite describir la evolución del producto durante el proceso de acetificación.

Las calibraciones desarrolladas permiten una estimación fiable para la suma de ésteres etílicos y alcoholes superiores presentes durante el proceso de acetificación. En el caso de los otros tres grupos de compuestos estudiados, los errores encontrados permiten una estimación aproximada. Con estos resultados, la FT-IR se postula como una técnica válida para el seguimiento del proceso de acetificación y control del mismo en base a la producción y variación de componentes relacionados con el aroma del vinagre.

VII.5. Bibliografía.

- [1] M.I. Guerrero, F.J. Heredia, A.M. Troncoso, J. Sci. Food Agric. 66 (1994) 209.

- [2] C. Llaguno, M.C. Polo, “El vinagre de vino”. Ediciones del CSIC, 1991, Madrid.
- [3] W. Tesfaye, M.L. Morales, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, *Trends Food Sci. Tech.* 13 (2002) 12
- [4] S. Arnold, T. Becker, A. Delgado, F. Emde, A. Enenkel, *J. Biotech.* 97 (2002) 133.
- [5] M.L. Morales, W. Tesfaye, M.C. García-Parrilla, J.A. Casas, A.M. Troncoso, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 611.
- [6] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A.* 1104 (2006) 47.
- [7] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A.* 1167 (2007) 18.
- [8] V. Dixit, J.C. Tewari, B.K. Cho, J.M.K. Irudayaraj, *Appl. Spectrosc.* 59 (2005) 1553.
- [9] H.H. Nieuwoudt, B.A. Prior, I.S. Pretorius, M. Manley, F.F. Bauer, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3726.
- [10] C.D. Patz, A. Blieke, R. Ristow, H. Dietrich, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 81.
- [11] M. Valcárcel, S. Cardenas, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 67.
- [12] I. García, D. Cantero, C. Jiménez, S. Baena, J. Jiménez, I. Santos, J. Bonilla, F. Barja, *J. Food Eng.* 80 (2007) 460
- [13] D. Garrido, I. Esteban, N. Pérez, J.M. González, C. Pizarro, *J. Near Infrared Spectrosc.* 12 (2004) 15
- [14] M.J. Saiz-Abajo, J.M. González-Saiz, C. Pizarro, *Food Chem.* 99 (2006) 615.
- [15] S.A. Kupina, A.J. Shrikhande, *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (2003) 131.
- [16] M. Palma, C.G. Barroso, *Talanta* 58 (2002) 265.
- [17] J. Nieto, M.A. González-Viñas, P. Barba, P.J. Martín-Álvarez, L. Aldave, E. García-Romero, M.D. Cabezudo, “Recent Process in wine vinegar R & D and some indicators for the future”, en: *Food Flavor*,

Ingredients and Composition, Ed: G. Charalambous, Elsevier Science, New York, 1993, pág. 469.

- [18] T. Asai, “Acetic Acid Bacteria Classification and Biochemical Activities”. Servicio de publicaciones de la Universidad de Tokio, Tokio, 1968.
- [19] D.D. Jones, R.N. Greenshields, *J. Int. Brew.* 77 (1971) 160.

VIII DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VINAGRES PROCEDENTES DE DISTINTAS MATERIAS PRIMAS.

VIII.1. Introducción.

El vinagre, como se ha indicado en el capítulo primero, es un producto proveniente de una doble fermentación. Primero, la fermentación alcohólica que es llevada a cabo por la acción de levaduras, que transforman azúcares en alcohol, y, luego, la fermentación acética que proviene de la acción de la bacteria *Acetobacter*, entre otras, transformando el alcohol en ácido.

Los productos disponibles como “vinagre” en el mercado provienen de diferentes materias primas y procesos de producción. En algunos casos estos procesos de producción incluyen un periodo de envejecimiento en madera. El vinagre de vino se obtiene de la acetificación de vinos blancos o tintos. Su acidez es del 6% o mayor y su contenido en alcohol, menor que el 1.5%.

Entre ellos, el vinagre de vino procedente de la denominación de origen Jerez-Xérès-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar y Vinagre de Jerez (suroeste de España), se obtiene a partir de vinos de Jerez que han seguido métodos de vinificación tradicionales [1]. El vinagre balsámico de Módena industrial o semi-industrial se obtiene mezclando mosto concentrado con vinagre envejecido. Aparte de estos, se pueden encontrar otros vinagres provenientes de manzana, malta, miel y otros sustratos azucarados.

Tan importante como obtener un vinagre de calidad específica, es la necesidad de determinar objetivamente los parámetros apropiados que

permiten caracterizar y diferenciar distintos vinagres. Se pueden encontrar diferentes estudios en la bibliografía con el objetivo de caracterizar y diferenciar este producto. Antonelli y col. [2] emplearon el contenido en polialcoholes para diferenciar los vinagres de diferentes materias primas; García-Parrilla y col. [3] emplearon el contenido polifenólico; Casale y col. [4] y Pizarro y col. [5] emplearon los compuestos volátiles para diferenciar vinagres de diferentes materias primas y procesos de producción (con y sin envejecimiento en madera).

Con el mismo objetivo, Natera y col. [6] desarrollaron varias aproximaciones de diseños de reconocimiento, que permitían la clasificación de muestras de vinagre de acuerdo a su materia prima (vino, sidra, alcohol, etc.) y su proceso de producción, empleando diferentes parámetros analíticos como el contenido polifenólico, los ácidos orgánicos y los compuestos volátiles. En este estudio, se observó una mayor participación de los compuestos volátiles en la diferenciación de vinagres de acuerdo al envejecimiento en madera.

Como se puede observar, se han empleado varios parámetros químicos (polialcoholes, polifenoles, compuestos volátiles, ácidos orgánicos, etc.) para caracterizar vinagres de diferentes orígenes. A pesar de los buenos resultados obtenidos en estos trabajos, es importante tener en cuenta que la mayoría de las metodologías analíticas que se emplearon requieren bastante tiempo y trabajo.

En los últimos años, han ganado una amplia aceptación en diferentes campos el uso de diferentes métodos basados en espectroscopía infrarroja. Estos métodos se caracterizan por su alta rapidez, la ausencia de una fase previa de preparación de muestra y su limpieza, debido a que no emplean reactivos para las determinaciones.

Estas características los convierten en técnicas apropiadas no sólo para el desarrollo de estrategias analíticas de vanguardia/retaguardia en el control de los procesos de producción [7], sino también para el análisis de diferentes analitos [8].

En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos para la determinación individual de compuestos de interés en vino y bebidas relacionadas, empleando la técnica de infrarrojo medio como sistema de medida, normalmente utilizando instrumentos basados en Transformada de Fourier [FT-IR; 9-11] y la espectroscopía de infrarrojo cercano [NIR; 12-15].

Por otro lado, ambos también se han empleado combinados con métodos de reconocimiento de diseño para discriminar entre vinos y otros productos enológicos pertenecientes a diferentes grupos [16-20].

Se encuentran escasas referencias en la bibliografía acerca del uso del FT-IR junto con las técnicas de reconocimiento mediante diseño para discriminar vinagres de diferentes orígenes. Solamente Del Signore [21] empleó espectros de infrarrojo medio para clasificar correctamente vinagres balsámicos tradicionales y no tradicionales.

El objetivo de este capítulo es estudiar el uso potencial de la espectroscopía FT-IR combinada con técnicas multivariantes para diferenciar muestras de vinagres procedentes de diferentes procesos de producción (con y sin envejecimiento en madera) y diferentes materias primas.

En un estudio previo [6], se obtuvo una buena clasificación de varias muestras de vinagres empleando diferentes parámetros analíticos como el

contenido polifenólico, los ácidos orgánicos y los compuestos volátiles. Teniendo en cuenta estos resultados previos, se ha llevado a cabo en el presente trabajo un estudio comparativo de clasificación empleando ambas metodologías (FT-IR y diferentes parámetros analíticos).

VIII.2. Materiales y métodos.

VIII.2.1. Muestras de vinagres.

Se analizaron 50 muestras de vinagre provenientes de diferentes materias primas (vinos tintos y blancos, mosto cocido y sidra) y producidos mediante diferentes métodos (con y sin envejecimiento en madera). En el caso de los vinagres de vino blanco, la mitad de ellos procedían de la denominación de origen Jerez-Xérès-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar y Vinagre de Jerez y, a partir de ahora, se les denominará vinagres de Jerez.

Las muestras se dividieron en diferentes categorías, cuatro en función de la materia prima (mosto cocido, vino blanco, vino tinto y sidra) y dos en función del método de envejecimiento (con y sin madera).

VIII.2.2. Compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles se determinaron mediante SBSE y cromatografía gaseosa. El método de SBSE había sido optimizado previamente para la determinación de este tipo de compuestos en vinagres [22, 23].

De manera breve, las extracciones se llevaron a cabo empleando barras agitadoras de PDMS comerciales de 10 mm x 0.5 mm (longitud x anchura) suministradas por Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany). Se

pipeteó un volumen de 25 ml de muestra y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 100 ml con 5.85 g de cloruro sódico y 50 µl de una disolución de 4-metil-2-pentanol (2.27 g/l en agua Milli-Q conteniendo 80 g/l de ácido acético). La barra agitadora se sometió a agitación a 1250 rpm durante 120 minutos a 25°C. Las barras agitadoras se desorbieron térmicamente en una unidad de desorción térmica comercial TDS-2 (Gerstel) conectado a un inyector CIS-4 de vaporización a temperatura programada (PTV) (Gerstel) mediante una línea de transferencia de calor. La unidad de termodesorción estaba equipada con un automuestreador MPS2L (Gerstel). Se realizaron análisis mediante GC-MS capilar en el modo de impacto electrónico empleando un sistema Agilent 6890 GC-5973N MS (Agilent, Little Falls, DE, EE.UU.), equipado con una columna capilar DB-Wax (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 60 m x 0.25 mm d.i., con un recubrimiento de 0.25 µm. El detector de masas operó en modo EI+ a 70eV en un rango de 30 a 400 amu.

La identificación de los picos se llevó a cabo usando la librería Wiley por analogía con los espectros de masas y fueron confirmados por los índices de retención de los patrones, cuando fue posible, o con los datos de retención encontrados en la bibliografía. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa del ion molecular de cada compuesto en relación a la del 4-metil-2-pentanol, el patrón interno.

VIII.2.3. Compuestos polifenólicos.

Se analizaron mediante HPLC, 80 µl de cada vinagre después de filtración (0.45 µm de tamaño de poro) por duplicado. Las fases de elución empleadas fueron: disolvente A (95% de agua, 5% de metanol) y disolvente B (95% de metanol, 5% de agua) a un pH 2.5 (ácido sulfúrico extra puro). El

gradiente de elución fue: de 100% a 85% de disolvente A en 5 minutos; de 85% a 50% de disolvente A en 40 minutos; y elución isocrática durante 35 minutos. Los análisis se realizaron empleando una columna C18 (Lichropher 100 RP-18, 250 mm x 3 mm, 5 mm de tamaño de partícula) a un flujo de 0.5 ml/min y la detección a 280 y 320 nm. Los diferentes polifenoles fueron identificados mediante comparación con una biblioteca de espectros DAD y con el tiempo de retención de los patrones. Los patrones comerciales fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza) y por Eastman Kodak (Rochester, NY, EE.UU.). Los ácidos caftárico y cutárico se aislaron empleando el método descrito por Singleton y colaboradores [24]. Cada compuesto se cuantificó empleando la curva de calibrado construida a partir del patrón correspondiente, excepto el GRP (ácido 2-S glutationil caftárico), que se cuantificó como el caftárico.

VIII.2.4. Ácidos orgánicos.

El contenido en ácidos orgánicos fue analizado mediante un método de cromatografía de exclusión iónica con detección conductimétrica que se desarrolló previamente [25, 26]. Se determinaron cinco ácidos orgánicos: tartárico, málico, succínico, láctico, fórmico y acético. En esta metodología, para incrementar la sensibilidad de detección, se añadió al eluyente de columna un tampón de pH 6.5, para asegurar que los analitos fueran ionizados.

VIII.2.5. Infrarrojo medio.

El equipo de FT-IR empleado fue un MultiSpec (TDI, Barcelona, España). Los espectros fueron recogidos entre 900 y 3000 cm^{-1} . Las muestras fueron analizadas por duplicado y el espectro de cada a análisis se obtuvo de la media de un total de 26 espectros. Las muestras se filtraron a

través de filtros de 0.45 μm antes de introducirlos en la unidad. La temperatura de trabajo se fijó en 25°C.

VIII.2.6. Técnicas multivariantes.

El análisis multivariante de los datos incluyó un análisis de componentes principales (principal component analysis, PCA, empleando el paquete estadístico StatGraphics Centurion, versión 15.0, Statpoint Inc., Virginia, EE.UU.), análisis de regresión discriminante mediante mínimos cuadrados parciales (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA, empleando el paquete estadístico The Unscrambler 9.6, CAMO, ASA, Noruega) y análisis lineal discriminante por pasos (stepwise linear discriminant analysis, SLDA, empleando el programa estadístico SPSS, versión 14.0 Inc., Chicago, IL, EE.UU.). El PLS-DA es una variante de la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS). A cada muestra en el set de calibración, se le asignó una variable indicadora (dummy) como valor de referencia [27] (para las materias primas, mosto cocido=1, vino blanco=2, vino tinto=3, y manzana=4; y para el envejecimiento en madera, como madera=1, y sin madera=0). La clasificación de las muestras de vinagre se realizó en base al valor de corte de 0.5. Para el estudio de clasificación en función de las materias primas se empleó un modelo de regresión PLSII, mientras que para el envejecimiento en madera el modelo de regresión fue PLSI.

SLDA es una técnica de clasificación supervisada donde el número de categorías y las muestras que pertenecen a cada categoría se definen previamente. El criterio del SLDA para la selección de las variables latentes es la diferenciación máxima entre las categorías y minimiza la varianza dentro de las categorías [27].

Los modelos de calibración se desarrollaron empleando una validación cruzada completa (el método de “leave one out”). El número de variables latentes en estos modelos se estableció mediante la función “mean square PRESS” (la predicción promedio de la suma de cuadrados, calculados del conjunto de tests de validación cruzada) [27].

VIII.3. Resultados y discusión.

VIII.3.1. FT-IR.

Un espectro típico de FT-IR se muestra en la figura VIII.1.

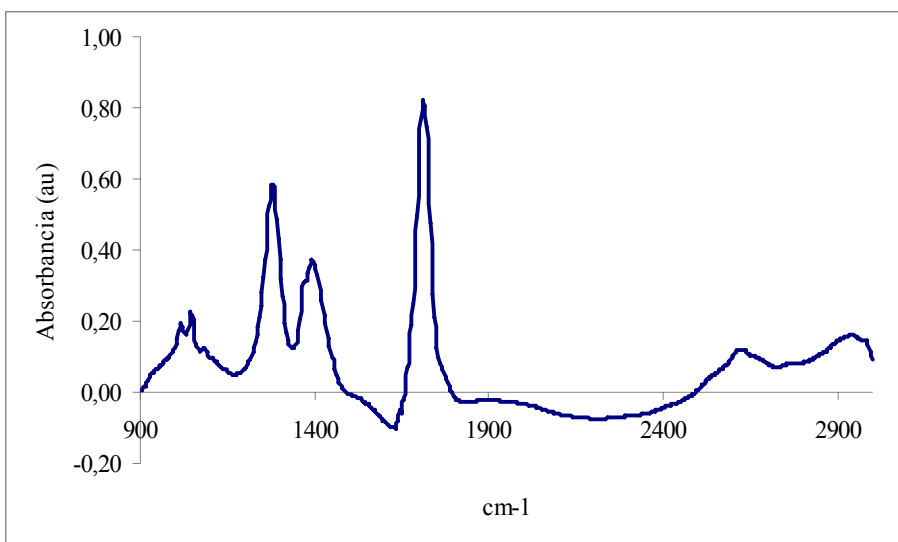


Figura VIII.1. Espectro FT-IR completo de una muestra de vinagre

El pico de absorción del agua, entre 1543 y 1717 cm^{-1} , se eliminó para quitar ruido del espectro. Solamente se emplearon las zonas entre 1200-1400 cm^{-1} y 2700-3000 cm^{-1} , que ya habían demostrado buenos resultados para muestras similares en un estudio previo [19].

VIII.3.1.1. Análisis de componentes principales. PCA.

El PCA (principal component analysis) se aplicó al espectro bruto. Los datos se estandarizaron para basar el análisis en la matriz de correlación de las muestras, mejor que en la matriz de covarianza de las muestras. Esto corresponde a estandarizar cada variable introducida antes de calcular las covarianzas, restándole su media y dividiéndola por su desviación estándar. La figura VIII.2 muestra el diagrama de resultados de los dos primeros componentes principales.

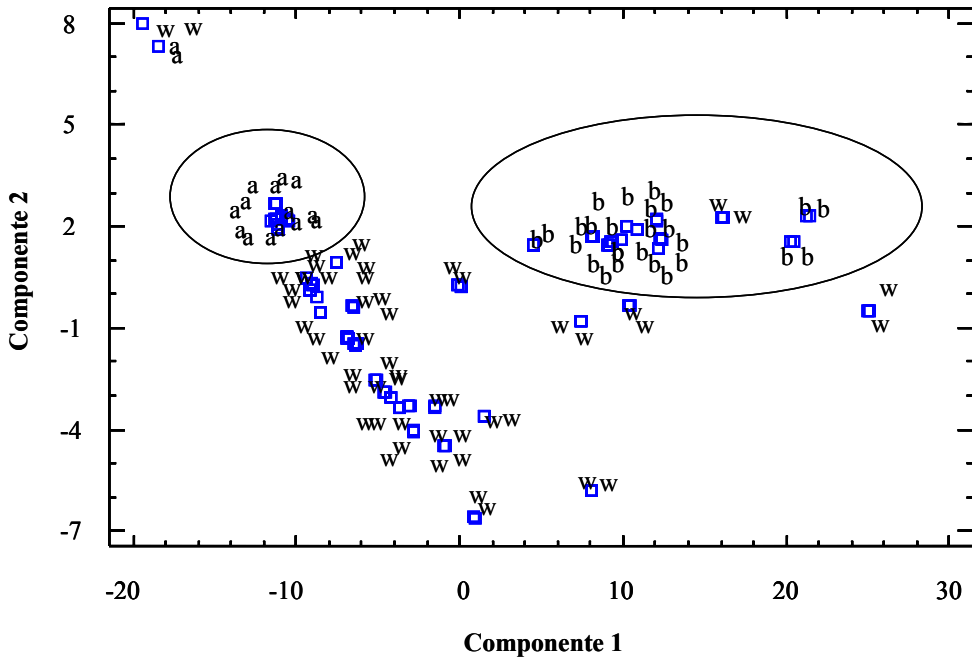


Figura VIII.2. Diagrama de resultados del PCA basado en los espectros de FT-IR de las muestras de vinagre. a: vinagre de manzana; w: vinagre de vino blanco; r: vinagre de vino tinto; b: vinagre balsámico.

Los dos primeros componentes principales explican el 99.5% de la varianza total de los espectros de las muestras de vinagres estudiadas. Se

puede observar una buena separación entre los vinagres balsámicos (procedentes de mosto cocido) y los vinagres de manzana. Los vinagres de vino tinto y blanco se situaban entre ellos. No se obtuvo separación entre los vinagres de vinos tintos y blanco con y sin envejecimiento en madera. Los vinagres de vino blanco procedentes de Jerez (vinagres de Jerez) se entremezclaban con los vinagres de vino blanco procedentes de otras zonas geográficas (vinagres no de Jerez). Como se puede observar, la distribución de las muestras en función de su materia prima es obvia.

La figura VIII.3 muestra los *eigenvectors* correspondientes al PC1 (93.5%) y al PC2 (6.0%). Para el PC1, solamente la zona entre 1270 y 1315 cm^{-1} mostraba una contribución más baja, mientras que el mayor *eigenvector* en el PC2 se observaba en la región alrededor de 1270-1323 cm^{-1} y 1358-1400 cm^{-1} .

Teniendo en cuenta estos resultados, se llevó a cabo un segundo estudio empleando de forma separada ambas regiones, 1200-1400 cm^{-1} y 2700-3000 cm^{-1} .

Para la zona de 1200-1400 cm^{-1} , los dos primeros componentes principales explicaban el 99.9% de la varianza total en los espectros de los vinagres, con el 89.8% para el PC1 y el 10.1% para el PC2. La distribución de las muestras en el plano definido por estos dos componentes principales fue muy similar a la obtenida previamente (figura VIII.2).

Por otra parte, para la zona entre 2700-3000 cm^{-1} , solamente se extrajo un componente principal que explicaba el 98.7% de la varianza total de los espectros de las muestras.

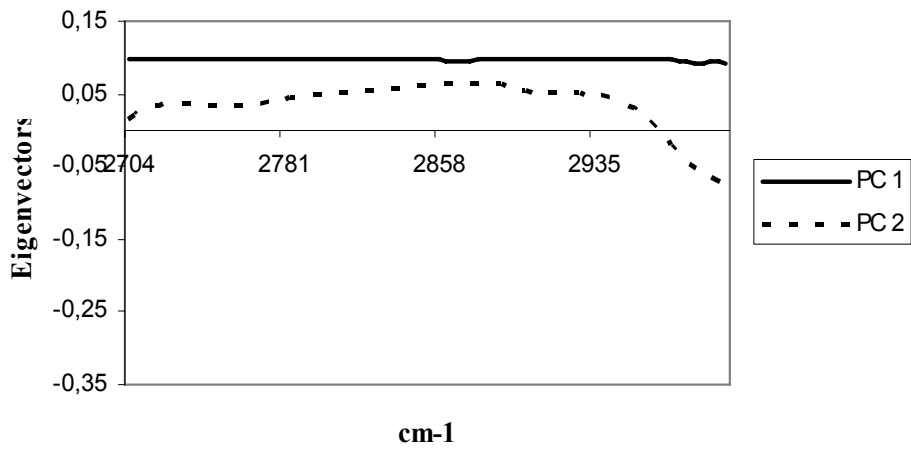
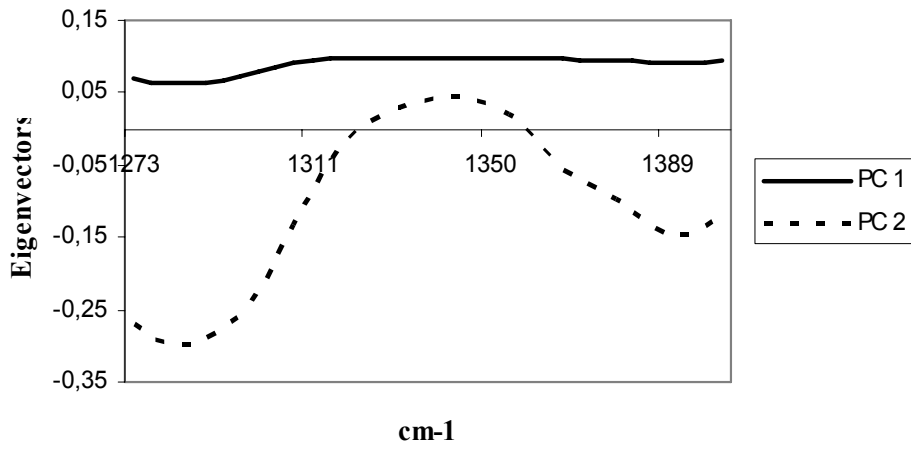


Figura VIII.3. Datos de FT-IR. PCA. Eigenvectors de los dos primeros componentes principales

VIII.3.1.2. Discriminación. PLS-DA y SLDA.

Para el estudio de discriminación en base a las materias primas (mosto cocido, vino blanco, vino tinto y manzana), la figura VIII.4 muestra el diagrama de resultados de los dos primeros componentes principales del modelo PLS-DA desarrollado, empleando ambas zonas espectrales del IR. Como se puede observar, este diagrama es la imagen especular horizontal de la obtenida en el PCA. Se emplearon seis factores. El coeficiente de correlación global resultante (r) y la raíz del error medio de predicción al cuadrado (root mean square error of prediction, RMSEP) fueron 0.92 y 0.17 respectivamente. Se obtuvieron resultados similares cuando solamente se empleaba la zona entre 2700 y 3000 cm^{-1} .

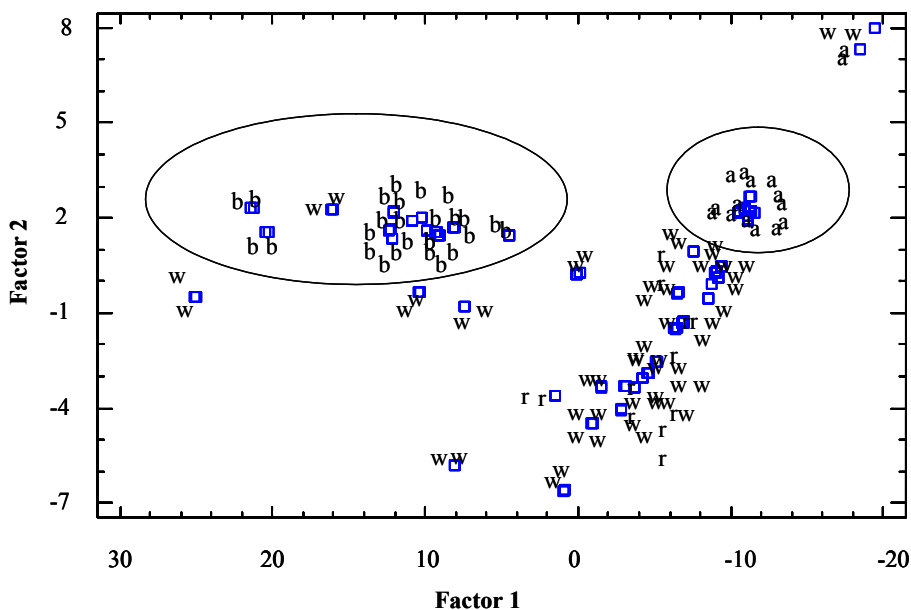


Figura VIII.4. Diagrama de resultados del PLS-DA de los dos primeros factores empleando los espectros FT-IR de las muestras de vinagre. a: vinagre de manzana; w: vinagre de vino blanco; r: vinagre de vino tinto; b: vinagre balsámico.

La calibración estadística indicaba que los modelos PLS-DA desarrollados podían ser aceptables para clasificar nuevas muestras de acuerdo a su materia prima. Sin embargo, en el caso de la clasificación de acuerdo al envejecimiento en madera, el mejor coeficiente de correlación, obtenido, empleando ambas zonas del infrarrojo, solamente fue de 0.82 (con un RMSEP de 0.29). En este caso se emplearon diez factores.

Tabla VIII.1. Datos de IR. SLDA de acuerdo a la materia prima y al envejecimiento en madera. Reclasificación de las muestras de vinagre por el método “leave one out”.

Categoría actual	N° de muestras	Categoría							
		Materia prima					Envejec. en madera		
		Balsámico	Vino		Manzana	con	sin		
			Blanco	Tinto					
Balsámico	Con envejec.	13	13	0	0	0	13	0	
	Sin envejec.	0							
Vino	Blanco	Con envejec.	14	0	17	3	3	13	10
		Sin envejec.	9						
	Tinto	Con envejec.	3	0	1	4	1	4	2
		Sin envejec.	3						
Manzana	Con envejec.	0	0	0	0	8	0	8	
	Sin envejec.	8							

En el caso del modelo SLDA, la tabla VIII.1 muestra la clasificación obtenida empleando ambas zonas del infrarrojo de acuerdo con las materias

primas y el envejecimiento en madera. Empleando solamente cada una de las zonas consideradas, se obtenían resultados similares.

Para las materias primas, el 83% de las muestras fue clasificado correctamente, mientras que para el envejecimiento en madera, este porcentaje fue ligeramente superior (89%). Para el primer criterio, varias muestras de vinagre de vino fueron clasificadas incorrectamente como vinagres de manzana. Para el envejecimiento en madera, algunos de los vinagres de vino tinto fueron clasificados de manera incorrecta.

Los resultados del SLDA y del PLS-DA evidencian la posibilidad de discriminar entre los vinagres de diferentes materias primas y con o sin envejecimiento, mediante los espectros de FT-IR.

VIII.3.2. Parámetros analíticos.

En este estudio se consideraron los compuestos volátiles, los polifenoles y los ácidos orgánicos.

VIII.3.2.1. Análisis de componentes principales. PCA.

El PCA se aplicó a los datos analíticos brutos. En este caso, estos datos fueron estandarizados. Cuando la matriz de datos fue sometida al PCA, aparecieron cinco componentes principales significativas de acuerdo al criterio Kraiser (*eigenvalues* > 1). La figura VIII.5 muestra el diagrama de resultados de los dos primeros componentes principales.

Los dos primeros componentes principales explican el 88.45% del total de la varianza de los parámetros analíticos de las muestras de vinagres estudiadas. Como se puede observar, el primer componente (PC1) separa las

muestras en tres grupos: vinagre de manzana, con valores negativos para este componente principal; vinagres de vino, y vinagres de mosto cocido (vinagres balsámicos) con valores positivos para PC1. El PC2 no muestra ninguna relación de estructuras.

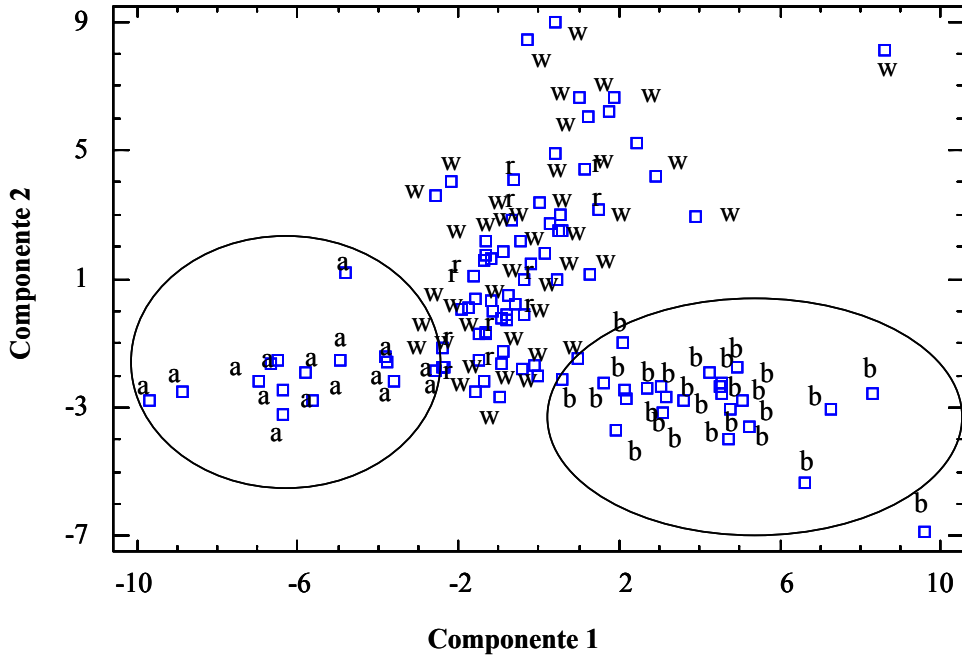


Figura VIII.5. Diagrama de resultados del PCA basado en los datos analíticos de las muestras de vinagre. a: vinagre de manzana; w: vinagre de vino blanco; r: vinagre de vino tinto; b: vinagre balsámico.

VIII.3.2.2. Discriminación. PLS y SLDA.

El modelo PLS-DA se desarrolló empleando los datos estandarizados. En el caso de la discriminación en función de las materias primas (mosto cocido, vino blanco, vino tinto y manzana) se emplearon siete componentes principales. El coeficiente de correlación global resultante (r) y la raíz del error de predicción cuadrado medio (RMSEP) fueron 0.90 y 0.21, respectivamente.

Para la clasificación en función del envejecimiento en madera, los resultados obtenidos fueron de 0.87 (r) y 0.24 (RMSEP) empleando, en este caso, 14 componentes principales.

Para la SLDA, la tabla VIII.2 muestra la clasificación obtenida en función de la materia prima y del envejecimiento en madera.

Tabla VIII.2. Datos analíticos. SLDA de acuerdo a la materia prima y al envejecimiento en madera. Reclasificación de las muestras de vinagre por el método “leave one out”.

Categoría actual		N° de muestras	Categoría					Envejec. en madera	
			Materia prima			Manzana	con	sin	
			Balsámico	Vino					
		Blanco		Tinto					
Balsámico	Con envejec.	13							
	Sin envejec.	0	13	0	0	0	12	1	
Vino	Blanco	Con envejec.	14						
	Sin envejec.	9	0	23	0	0	12	11	
	Tinto	Con envejec.	3						
	Sin envejec.	3	0	0	6	0	4	2	
Manzana	Con envejec.	0							
	Sin envejec.	8	0	1	0	7	1	7	

Para las materias primas, el 99% de las muestras se clasificaron correctamente, mientras que para el envejecimiento en madera, este porcentaje fue del 91%. Para el primer criterio, solamente una de las muestras de vinagre de manzana fue clasificada como vinagre de vino blanco. Para el envejecimiento en madera, ambas muestras, envejecidas y sin envejecer, fueron clasificadas incorrectamente.

Como se puede observar, estos parámetros analíticos son descriptores apropiados para diferenciar muestras de vinagre de acuerdo con el periodo de envejecimiento en madera y con la materia prima (mosto cocido, vino blanco, vino tinto y manzana). Esto ya se había observado en un estudio anterior [6] con muestras de vinagre de vinos tinto y blanco, manzana, malta, miel y alcohol, y producidos mediante diferentes métodos (con y sin envejecimiento en madera).

VIII.4. Conclusiones.

En conclusión, estos resultados demostraron que la espectroscopía de infrarrojo medio es útil para clasificar muestras de vinagre de diferentes materias primas y procesos de producción (con y sin envejecimiento en madera). Los porcentajes de clasificación correcta obtenidos fueron similares a los obtenidos empleando diferentes parámetros analíticos. Este hecho, además de las diferentes ventajas de esta técnica (su rapidez, el ser no destructivo, su bajo coste, sin necesidad de preparación de muestra, sin necesidad de personal de laboratorio cualificado, etc.) transforma la técnica de espectroscopía infrarroja en una herramienta prometedora para la clasificación de vinagres de diferentes materias primas y procesos de producción, con un grado de fiabilidad similar al obtenido empleando diferentes parámetros analíticos, que se llevan a cabo empleando un mayor coste y tiempo.

VIII.5. Bibliografía.

- [1] J.M. Quirós, *Quad. Scuola Spec. Vitic. Enol.* 2 (1990) 115.
- [2] A. Antonelli, G. Zeppa, V. Gerbi, A. Carnacini, *Food Chem.* 60 (1997) 403.
- [3] M.C. García-Parrilla, G.A. González, F.J. Heredia, A.M. Troncoso, J. *Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3487.
- [4] M. Casale, C. Armanino, C. Casolino, C.C. Oliveros, M. Forina, J. *Agric. Food Chem.* 12 (2006) 223.
- [5] C. Pizarro, I. Esteban-Díez, C. Sáenz-González, J.M. González-Sáiz, *Anal. Chim. Acta* 698 (2008) 38.
- [6] R.Natera, R. Castro, M.V. García-Moreno, C. García-Barroso, J. *Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3345.
- [7] M. Valcárcel, S. Cardenas, *TRAC-Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 67.
- [8] D. Wu, Y. He, S. Feng, *Anal. Chem. Acta* 610 (2008) 232.
- [9] V. Dixit, J.C. Tewari, B.K. Cho, J.M.K. Irudayaraj, *Appl. Spectrosc.* 59 (2005) 1553.
- [10] H.H. Nieuwoudt, B.A. Prior, I.S. Pretorius, M. Manley, F.F. Bauer, J. *Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3726.
- [11] C.D. Patz, A. Blicke, R. Ristow, H. Dietrich. *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 81.
- [12] M.J. Sáiz-Abajo, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *Food Chem.* 99 (2006) 615.
- [13] D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, E.J. Waters, M. Gishen, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2289.
- [14] H.E. Smyth, D. Cozzolino, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M. Sefton, M. Gishen, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1911.
- [15] D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, R.G. Damberg, W.U. Cynkar, L.J. Janik, G. Skouroumounis, M. Gishen, *Talanta* 74 (2008) 711.

- [16] L. Liu, D. Cozzolino, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, L. Janik, B.K. O'Neill, C.B. Colby, M. Gishen, *Food Chem.* 106 (2007) 781.
- [17] D. Cozzolino, R.G. Damberg, L. Janik, W.U. Cynkar, M. Gishen, *J. Near Inf. Spec.* 14 (2006) 279.
- [18] L. Liu, D. Cozzolino, W.U. Cynkar, M. Gishen, C.B. Colby, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6754.
- [19] M. Palma, C.G. Barroso, *Talanta* 58 (2002) 265.
- [20] C.J. Bevin, A.J. Fergusson, W.B. Perry, L.J. Janik, D. Cozzolino, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9713.
- [21] A. Del Signore, *J. Com. Sci.* 39 (2000) 159.
- [22] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 47.
- [23] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 18.
- [24] V.L. Singleton, C.F. Timberlake, A.G.H. Lea, *J. Sci. Food Agric.* 29 (1978) 403.
- [25] D.A. Guillén, C.G. Barroso, L. Zorro, V. Carrascal, J.A. Pérez-Bustamante, *Analisis* 26 (1998) 30.
- [26] R. Castro, M.V. García-Moreno, R. Natera, C.G. Barroso, *Chromatographia* 56 (2002) 57.
- [27] T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies, "A user-friendly guide to multivariate calibration and classification" NIR Publications, Chichester, U.K., 2002, pág: 420.

IX ESTUDIO DE LA TRAZABILIDAD DE LOS PRODUCTOS FITOSANITARIOS EN LA PRODUCCIÓN DEL VINAGRE DE JEREZ.

IX.1. Introducción.

Los productos fitosanitarios, y particularmente los pesticidas, son compuestos químicos empleados normalmente en la agricultura, para prevenir posibles daños originados por plagas de insectos, hongos u otras enfermedades de los cultivos, como por ejemplo las uvas. En el marco de Jerez, las familias de pesticidas más empleadas pertenecen al grupo de los compuestos organofosforados, tiocarbamatos, ftalimidias, bencimidazoles, dicarboximidias, triazinas y fenilureas, cada uno empleado para una enfermedad específica [1].

Una cantidad de pesticida permanece depositado en la uva y disminuye progresivamente a lo largo del tiempo, hasta que las uvas son vendimiadas, momento en el que un valor mínimo de residuo puede permanecer hasta el producto final, como el vino [2] o el vinagre de vino.

Es bien sabido que la actividad fermentativa puede verse afectada por la presencia de residuos de plaguicidas en la uva. Sin embargo existen diferentes trabajos en los que se pone de manifiesto que los insecticidas y acaricidas en concentraciones no excesivamente altas, no producen efectos en el desarrollo común de las fermentaciones; de este modo se ha comprobado que metomilo [3], clorpirifos [4] o metil paratión y fenitrotión [5], no producen efectos significativos en la cinética de la fermentación.

Sin embargo sí se han mostrado sensibles algunas levaduras frente a la presencia de residuos de fungicidas. El cobre [3, 6], compuestos orgánicos

como benomilo, bendazima, metiltiofanato [7-9] presentan efectos sobre levaduras. Vinclozolina, iprodiona, procimidona, ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil, quinoxifen, azoxistrobin, y kresoxim-metil, en cambio, no presentan efectos significativos [10-15]. Mientras que fungicidas como diclofuanida, captan o folpet, producen retardos en la fermentación a pequeñas dosis e incluso su inhibición a dosis elevadas [16].

La aparición de estos residuos de pesticidas en el vinagre final depende de varios factores, tantos como pasos existen en el proceso de producción desde la uva al vinagre, incluyendo los mostos y vinos intermedios [17]. Dependiendo del pesticida y del proceso de producción, la evolución será diferente. La degradación química es una vía de eliminación esencial y lógicamente depende de la estabilidad química de la molécula [18]. Algunas veces, se producen productos de degradación más tóxicos que la sustancia original, como puede ser el caso del metil paraoxon derivado del metil paratión [19]. La reducción del contenido de estos residuos puede ser causada por la absorción sobre la materia sólida y posterior eliminación con los orujos, a la acción de enzimas y levaduras, la adición de clarificantes, la hidrólisis ácida, o la fermentación acética entre otros procesos [13, 20, 21]. Pero incluso con todos estos procesos, algunos pesticidas pueden persistir hasta el vinagre final [22].

El análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) es una aproximación sistemática preventiva, focalizada en peligros físicos, químicos y biológicos, empleada más como medio de prevención que como inspección del producto final. El APPCC se emplea en la industria alimentaria para identificar peligros potenciales de seguridad alimentaria, de modo que las acciones correctoras, conocidas como puntos de control críticos (PCC) se pueden llevar a cabo para reducir o eliminar el riesgo de los peligros localizados.

En el caso de la producción de vinagre, los residuos de productos fitosanitarios se pueden considerar un PCC, por lo que se pueden proponer metodologías para su análisis, vigilancia y corrección. Se debe garantizar la trazabilidad y la seguridad alimentaria de vinagres procedentes de uvas tratadas con esta clase de productos, ya que no está asegurada al 100% la eliminación de los mismos, en la etapa posterior de fermentación.

Por otra parte, debido al cambio progresivo de hábitos de consumo y exigencias del consumidor, aparecen en el mercado un mayor número de productos, en general “ecológicos” u “orgánicos”, sin tratamiento alguno de productos fitosanitarios, y especialmente en vinagres de Jerez. De modo que, no sólo las compañías productoras de vinagre ecológico, sino también aquellas que aplican la seguridad alimentaria de sus productos, deben realizar el seguimiento de los niveles de pesticidas en el proceso completo de producción de vinagre.

La SBSE (stir bar sorptive extraction) es una técnica simple, fácil y desarrollada relativamente hace poco tiempo, donde una barra agitadora magnética recubierta de polidimetilsiloxano se añade a la muestra para transferir los analitos del recubrimiento polimérico, y, después de un tiempo predeterminado de extracción, los analitos se desorben térmicamente en el inyector del cromatógrafo de gases. Esta técnica ha sido empleada con éxito en el análisis de pesticidas en muestras alimentarias tales como vegetales [23], uvas [24], zumos [25], vino [26, 27] y vinagre [22]. Por otra parte, se ha estudiado la evolución de distintos pesticidas desde la uva hasta el producto vínico final, pasando por el proceso de vinificación [21, 28-31], pero hasta la fecha, nunca se había realizado un estudio completo de la trazabilidad de pesticidas en la producción de vinagre. En el presente trabajo, se ha realizado el seguimiento de la evolución de diferentes productos

fitosanitarios empleados en la producción de un vinagre de Jerez, cubriendo el proceso completo, desde la maduración de las uvas hasta la fermentación acética. Para las muestras de uvas, se consideró el empleo de dos métodos de extracción diferentes (extracción asistida mediante ultrasonidos y extracción asistida por microondas). Ambos métodos se optimizaron correctamente mediante diseños factoriales 2^4 y, finalmente, fueron comparados entre ellos. Después del proceso de extracción, los distintos extractos se analizaron mediante SBSE-GC-MS. Para el análisis de las muestras líquidas, como los mostos, vinos y vinagres, se empleó un método basado en SBSE-GC-MS y desarrollado previamente [22].

IX.2. Materiales y métodos.

IX.2.1. Reactivos.

Los pesticidas empleados (pirimetanil, flufenoxuron, clorpirifosmetil, vinclozolina, metalaxil, fenitrothion, malatión, dicofol, clorpirifos, ciprodinil, triadimenol, procimidona, hexitiazox, folpet, fludioxonil, iprodiona, benalaxil, fenhexamida) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (PESTANAL, Riedel-de Hën, Seelze, Alemania). Se preparó una disolución patrón madre, pesando con precisión 5-10 miligramos de cada pesticida individualmente, en un matraz aforado de 50 ml, disolviendo con acetona y enrasando con etanol. Las disoluciones de trabajo empleadas en el desarrollo analítico, se prepararon añadiendo diferentes cantidades de la disolución patrón madre sobre una cantidad de uva triturada y limpia, homogeneizando cuidadosamente antes del método de extracción. Las disoluciones patrón fueron almacenadas a 4°C

Como patrón interno fue empleado el epóxido de heptacloro, suministrado por Sigma-Aldrich.

Teniendo en cuenta la baja estabilidad de la iprodiona [27], se cuantificó a partir de su producto de degradación la (3,5-diclorofenil)hidantoína.

IX.2.2. Muestreo y condiciones de fermentación.

Todas las muestras de uva (variedad Palomino Fino) se muestrearon de una viña de la zona durante el proceso de maduración, de junio a septiembre del 2007. El muestreo se realizó periódicamente todas las semanas cubriendo el campo de estudio, tanto como fue posible. El número de racimos recolectados en cada muestreo estaba en torno a 25 ó 30. Los racimos, posteriormente, fueron mezclados y homogenizados, y se almacenaron a una temperatura de -20°C hasta que fueron analizados.

Las muestras de mosto y vino provenían de las uvas estudiadas, y el muestreo se llevó a cabo también de manera semanal, de septiembre del 2007 a junio del 2008, que fue cuando el vinagre fue producido. Durante la fermentación vínica (que duró aproximadamente tres semanas) el muestreo se realizó de un modo más exhaustivo, para controlar el proceso de mejor manera. Del mismo modo, durante el proceso de acetificación, que se realizó en tres días, se tomaron muestras dos veces al día hasta el final del proceso (7.92° de acidez y 1.60° Baumè).

Tanto la vinificación como la acetificación, se llevaron a cabo a escala industrial, de forma convencional [32]. De manera breve, para la fermentación alcohólica, el pH del mosto (obtenido mediante una presión neumática de 1.5 Kg/cm^2) se ajustó a 3.25, empleando ácido tartárico; se añadieron también 10 mg/l de equivalentes de SO_2 (metabisulfito potásico); la temperatura de fermentación se fijó en 25°C y se empleó como inóculo, la

levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para el caso de la fermentación acética, el proceso se llevó a cabo en un reactor cilíndrico de acero inoxidable y de fondo cóncavo, con una capacidad de 33000 l; el reactor operó en modo discontinuo y se sometió a aireación constante (70 m³/h) desde la parte inferior (cultivo sumergido); la temperatura se mantuvo en 32°C mediante refrigeración por camisa de agua fría.

El tratamiento fitosanitario empleado en la viña fue el que se describe a continuación: fungicidas Vimar Combi (folpet y metalaxil) en abril de 2007 y Dimenol (triadimenol) en mayo del 2007, ambos empleados contra el Oidium; insecticida Clorpirifos en junio de 2007, empleado contra la *Lobesia botrana* (responsable de la *Botrytis cinerea*).

IX.2.3. Preparación de muestra.

Las muestras sólidas (las uvas) fueron sometidas a procesos de extracción consecutivos. 10 gramos de muestra triturada se trataron empleando, o bien un método de extracción por ultrasonidos, usando 10 ml de metanol como disolvente durante 10 minutos, o bien un método de extracción por microondas, empleando 10 ml de metanol como disolvente durante 5 minutos y alcanzando una temperatura de 125°C. Después de esto, se centrifugaron aproximadamente 10 ml del extracto a 4000 rpm durante cinco minutos. Se tomaron 0.5 ml del líquido sobrenadante y fueron añadidos a 10 ml de agua Milli-Q en un matraz Erlenmeyer de 100 ml, para llevar a cabo la extracción mediante SBSE. Para ello se emplearon barras agitadoras comerciales recubiertas de PDMS de dimensiones 20 mm (largo) x 0.5 mm (ancho) y suministradas por Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Alemania). A cada muestra se añadieron 10 µl de la disolución de epóxido de heptacloro (342 µg/l en acetona). El matraz Erlenmeyer se situó en un agitador magnético de quince posiciones (Mülheim a/d Ruhr, Alemania) con

una agitación de 1000 rpm a 25°C durante 150 min. Una vez finalizada la extracción, la barra agitadora se lavaba con agua destilada y se secaba con un papel de celulosa. Finalmente, se llevaba a cabo la desorción térmica.

Las muestras líquidas (mostos, vinos y vinagres) se extrajeron empleando la metodología desarrollada en un estudio previo [22].

Después de cada análisis, se realizaba un proceso de limpieza (300°C durante 15 minutos). Una vez realizado este tratamiento, las barras agitadoras no mostraban ninguna señal medible de pesticidas.

IX.2.4. Equipamiento.

Durante el proceso de optimización de la extracción asistida por microondas, el sistema del microondas empleado fue un horno de sistema cerrado, ETHOS-1600 (Milestone, Shelton, CT, EE.UU.), equipado con diez vasijas de perfluoroalcóxido (PFA). Las extracciones se llevaron a cabo a 500 W.

El aparato empleado para realizar las extracciones asistidas por ultrasonidos era de la casa comercial Selecta (Barcelona, España).

En referencia a la extracción mediante SBSE, las barras agitadoras se desorbieron térmicamente empleando una unidad de desorción térmica TDS-2 (Gerstel) conectada a un inyector CIS-4 (Gerstel) de vaporización mediante temperatura programada (PTV) a través de una línea de transferencia de calor. El inyector PTV estaba instalado en un sistema Agilent 6890 GC-5973 MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). En el inyector PTV se usó un liner vacío. La unidad de termodesorción estaba equipada con un automuestreador MPS 2L (Gerstel) con capacidad de

muestrear hasta un total de 98 barras agitadoras. La temperatura de desorción se programó desde 30°C hasta 300°C (manteniendo esta temperatura durante 10 minutos) a una velocidad de 60°C/min bajo flujo de helio (75 ml/min) y los analitos desorbidos fueron crioconcentrados en el sistema PTV con nitrógeno líquido a -150°C. Finalmente, el sistema PTV se programó desde -150°C hasta 300°C (manteniendo durante 5 minutos esta temperatura) a una velocidad de 10°C/s para el análisis por GC-MS. Los análisis de GC-MS capilar, en el modo de impacto electrónico, se llevaron a cabo usando un sistema Agilent 6890 GC-5973N MS (Agilent, Little Falls, DE, EE.UU.) equipado con una columna capilar HP-5 (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 30 m x 0.25 mm de diámetro interno, con un recubrimiento de 0.25 µm. El gas portador fue el helio, usando un flujo de 1 ml/min. El horno de cromatografía gaseosa fue programado como se explica a continuación: mantenimiento a 70°C durante 2.5 minutos, en ese momento se producía una rampa de temperatura de 25°C/min hasta llegar a 150°C. A continuación se alcanzaban los 200°C a una velocidad de 3°C/min y los 300°C a 8°C/min, manteniéndose durante 10 minutos. El detector de masas operó en modo EI+ a 70eV. Se utilizó el modo SIM (selected ion monitoring), empleando para cada compuesto un ión cuantificador y dos o tres iones cualificadores.

IX.2.5. Diseño de experimentos.

Para el tratamiento de los datos se empleó el paquete estadístico “Statgraphics Plus 5.1” para Windows.

Los dos procesos de extracción estudiados, la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) y la extracción asistida por microondas (MAE) se optimizaron mediante diseños factoriales 2^4 . Para la UAE los cuatro factores analizados fueron: cantidad de muestra, volumen de disolvente, tiempo de

extracción y tiempo de centrifugación. Para la MAE, los factores estudiados fueron: cantidad de muestra, volumen de disolvente, temperatura de extracción y tiempo de extracción. La tabla IX.1 muestra los diferentes factores y sus valores máximos (+) y mínimos (-) para cada proceso de optimización.

Tabla IX.1. Valores máximos y mínimos de los factores estudiados en la optimización de los dos procesos de extracción.

Proceso	Factor	Bajo (-)	Alto (+)
Extracción asistida por ultrasonidos	Cantidad de muestra (g)	10 g	30 g
	Volumen de metanol (ml)	10 ml	50 ml
	Tiempo de extracción (min)	10 min	20 min
	Tiempo de centrifugación (min)	5 min	15 min
Extracción asistida por microondas	Cantidad de muestra (g)	2 g	10 g
	Volumen de metanol (ml)	10 ml	30 ml
	Tiempo de extracción (min)	5 min	20 min
	Temperatura de extracción (min)	75°C	125°C

IX.3. Resultados y discusión.

IX.3.1. Desarrollo del método de extracción.

Se desarrollaron dos métodos de extracción (por ultrasonidos y por microondas) a partir de aproximaciones estadísticas. Se emplearon diseños factoriales 2^4 , que constaban de 17 experimentos por duplicado, cada uno. Se seleccionó como respuesta para la optimización, el área cromatográfica total de los iones cuantificadores correspondientes a todos los pesticidas estudiados. Después de esto, los dos métodos se compararon para elegir el óptimo para la extracción de pesticidas en las uvas.

IX.3.1.1. Extracción asistida por ultrasonidos. Estudios previos.

El punto de partida fue un método de extracción por ultrasonidos [23] que pareció ser adecuado para el análisis de pesticidas en uvas y, a partir de ahí, se chequeó la posibilidad de emplear diferentes disolventes en el método de extracción. Se llevaron a cabo diferentes pruebas para establecer qué disolvente era el óptimo para la extracción de los pesticidas y qué influencia en el proceso tenía la centrifugación o filtración de los extractos.

Se pesó una cantidad total de uva limpia, triturada, y adicionada con una cantidad conocida de pesticidas y mezclada durante cinco minutos. Para llevar a cabo cada prueba, se emplearon 15 gramos de la mezcla y se emplearon 30 ml de metanol, acetona, acetonitrilo, etanol y agua y se filtró (0.45 μm con un prefiltro de 0.1 μm) o centrifugó (4000 rpm durante seis minutos). Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Después de esto, se analizaron los extractos empleando la SBSE. La figura IX.1 muestra los resultados de la suma de las medias de las áreas relativas de todos los pesticidas estudiados frente al disolvente empleado, filtrando o centrifugando.

A la vista de los resultados, con la centrifugación se obtuvieron los mejores resultados con casi todos los disolventes, y con el metanol se obtuvieron los mayores valores de áreas relativas (área del pesticida/área del P.I.). Por tanto, se eligió la combinación de centrifugación y metanol para continuar el estudio.

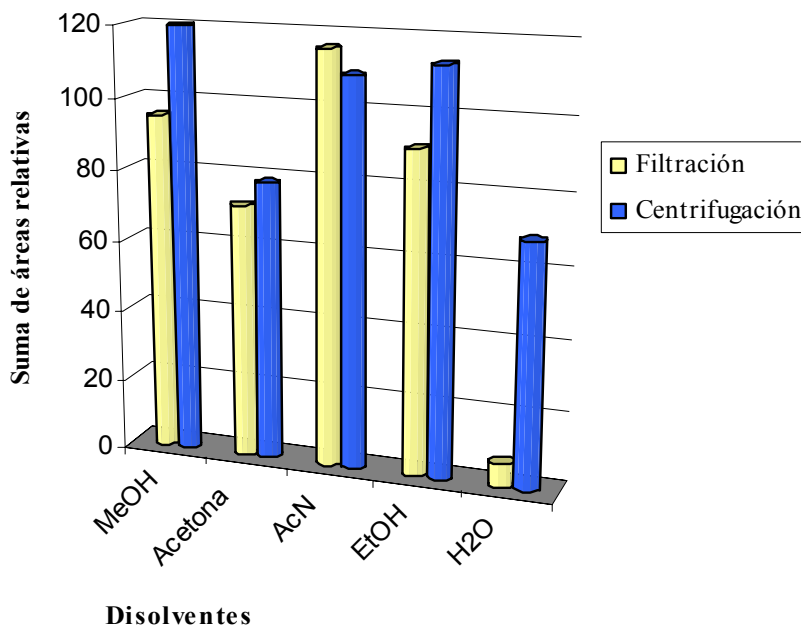


Figura IX.1. Respuesta total obtenida de los pesticidas en las diferentes pruebas con los disolventes, filtrando o centrifugando el extracto. Extracción asistida por ultrasonidos.

Disolventes estudiados: metanol (MeOH); acetona; acetonitrilo (AcN); etanol (EtOH); agua (H2O).

IX.3.1.2. Método de extracción asistida por ultrasonidos.

Optimización de las condiciones de extracción.

Para obtener las mejores condiciones analíticas, se evaluó la cantidad de muestra, el volumen de disolvente, el tiempo de extracción y el tiempo de centrifugación. Los datos obtenidos se evaluaron mediante ANOVA con un nivel de significación del 5%. Estos resultados se muestran en un diagrama de barras con los efectos ordenados en función de su influencia (figura IX.2).

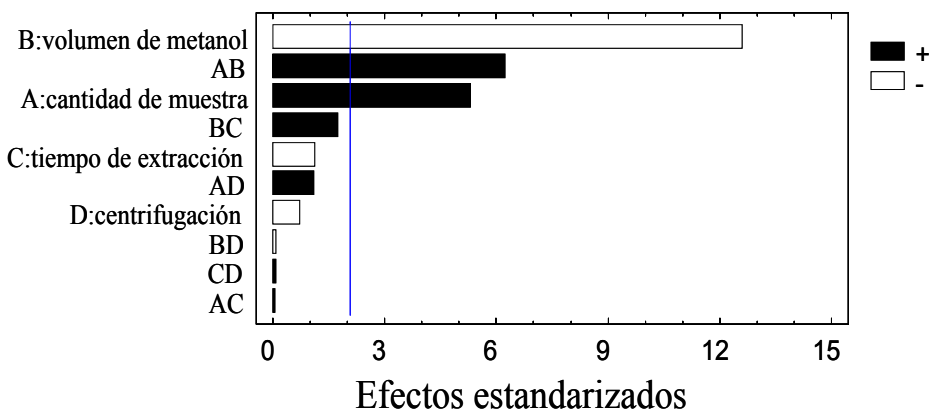


Figura IX.2. Diagrama de Pareto de los principales efectos para los pesticidas estudiados. La línea representa el nivel de significación. Extracción asistida por ultrasonidos.

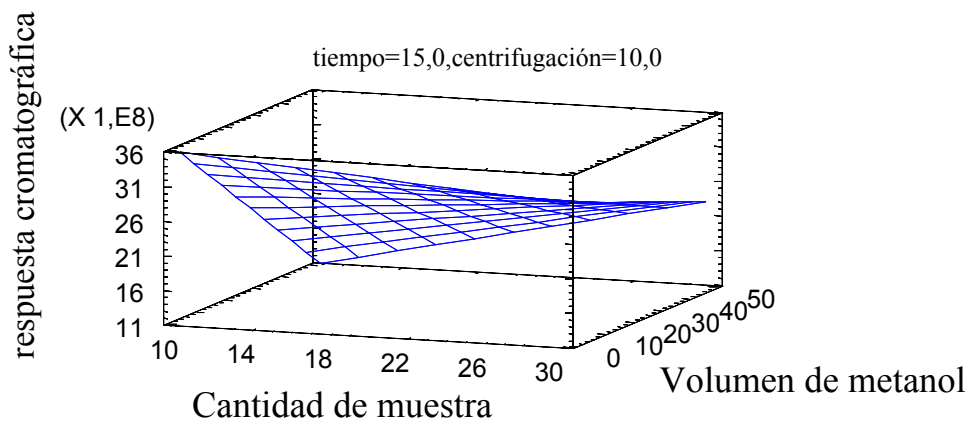


Figura IX.3. Superficie de respuesta obtenida al representar cantidad de muestra frente a volumen de metanol. Extracción asistida por ultrasonidos.

El volumen de metanol presentó el efecto más significativo, mostrando un signo negativo. La cantidad de muestra también fue un parámetro significativo, mostrando un signo positivo, mientras que el tiempo de centrifugación y el tiempo de extracción no tuvieron efectos significativos

($p < 0.05$). La figura también muestra una interacción positiva entre la cantidad de muestra y el volumen de disolvente. La figura IX.3 representa la superficie de respuesta estimada teniendo en cuenta la mencionada interacción.

Cuando el volumen de metanol empleado era bajo, se obtenía una mayor respuesta con cantidades de muestra menores. Por tanto, las condiciones finales seleccionadas para la extracción asistida con ultrasonidos fueron:

- ✓ Cantidad de muestra: 10 g
- ✓ Volumen de metanol: 10 ml
- ✓ Tiempo de extracción: 10 min
- ✓ Tiempo de centrifugación: 5 min

IX.3.1.3. Extracción asistida por microondas. Estudios previos.

Como punto de partida se emplearon unas condiciones medias [33, 34], para comparar diferentes disolventes normalmente empleados en este tipo de extracciones. Se extrajeron 5 gramos de muestra con 20 ml de acetona, acetonitrilo, etanol, metanol y agua sucesivamente, alcanzando 100°C durante diez minutos con una agitación del 30%. El tiempo de refrigeración empleado fue de 20 minutos y todos los extractos fueron centrifugados. La figura IX.4 muestra los valores medios ($n=3$) de las áreas relativas de todos los pesticidas estudiados frente al disolvente empleado. Como se puede observar, el metanol actuó como el mejor extractante para todos los pesticidas y, por tanto, fue empleado como disolvente en las pruebas sucesivas.

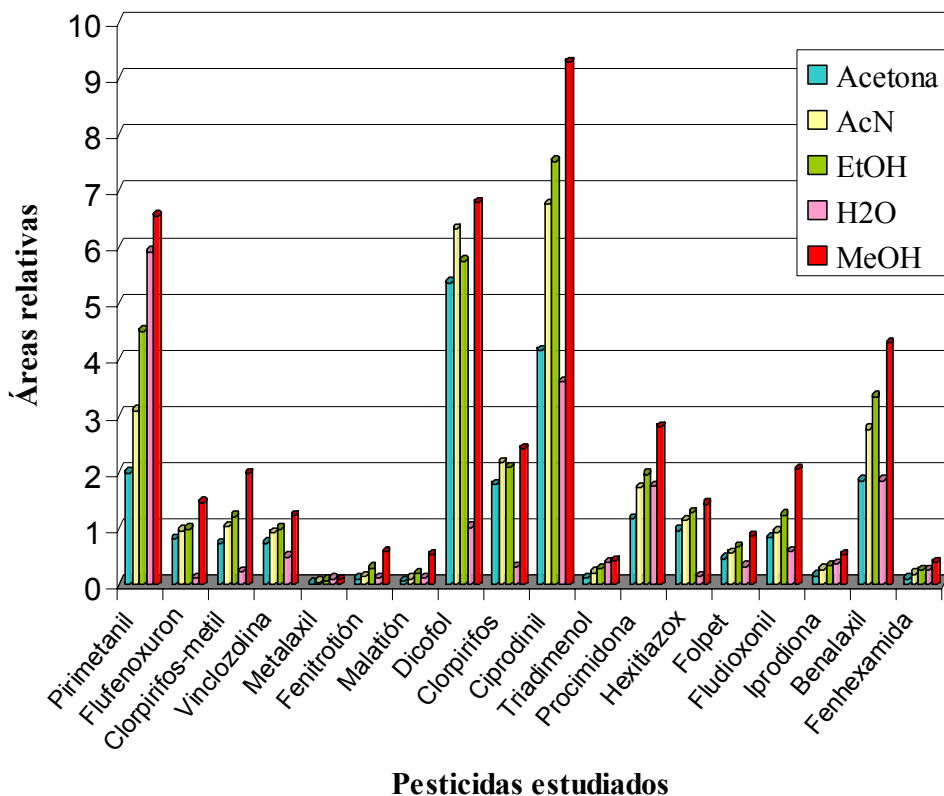


Figura IX.4. Respuesta media obtenida para cada pesticida a partir de las distintas pruebas de disolventes. Extracción asistida por microondas. Disolventes estudiados: acetona; acetonitrilo (AcN); etanol (EtOH); agua (H₂O); metanol (MeOH).

IX.3.1.4. Método de extracción asistida por microondas.

Optimización de las condiciones de extracción.

Para obtener las mejores condiciones analíticas globales, se evaluaron la cantidad de muestra, el volumen de disolvente, la temperatura de extracción y el tiempo de extracción. Los resultados de la evaluación mediante ANOVA (nivel de significación del 5%) de los datos obtenidos se muestran en un diagrama de barras (figura IX.5).

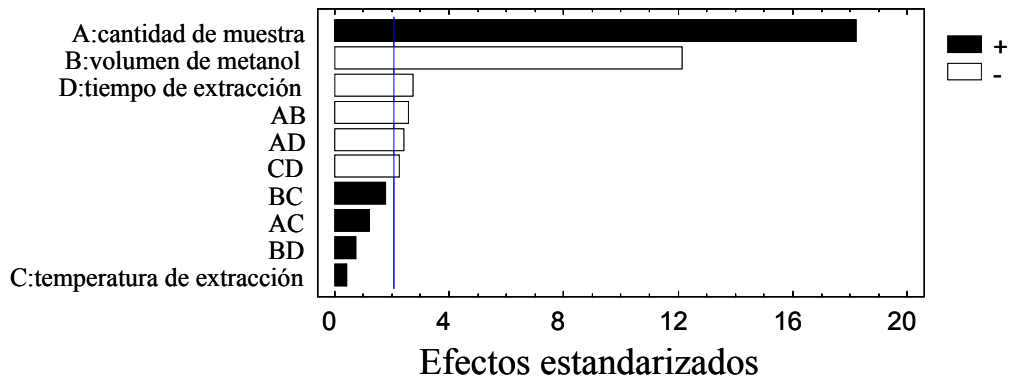


Figura IX.5. Diagrama de Pareto de los principales efectos para los pesticidas estudiados. La línea representa el nivel de significación. Extracción asistida por microondas.

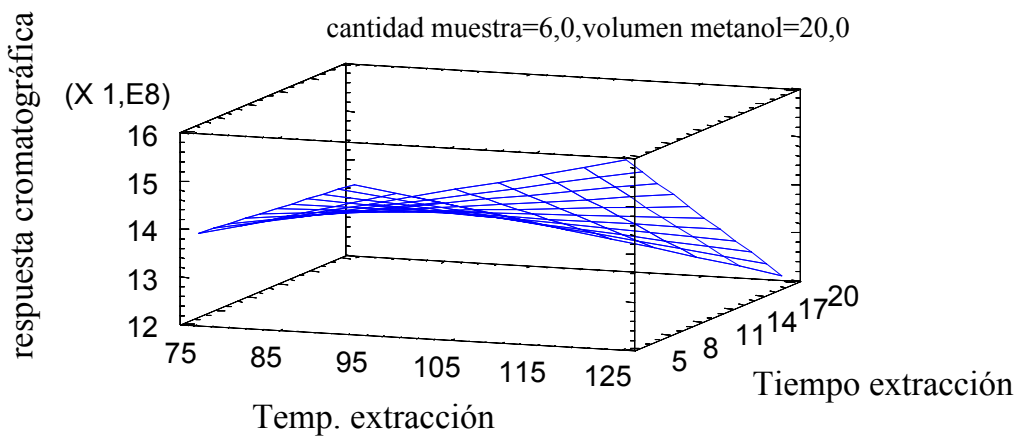


Figura IX.6. Superficie de respuesta obtenida al representar temperatura de extracción frente a tiempo de extracción. Extracción asistida por microondas.

La cantidad de muestra fue la variable más influyente, mostrando un signo positivo. El volumen de disolvente también fue influyente pero mostraba un signo negativo. El tiempo de extracción y la temperatura de extracción tenían un efecto muy bajo o no significativo ($p < 0.05$). Existen

varias interacciones entre las variables, pero la más interesante es la interacción temperatura de extracción-tiempo de extracción (figura IX.6).

Cuando se emplean tiempos de extracción más cortos, unos valores de temperatura de extracción mayores permitían mayores valores de respuesta analítica. Por tanto, las condiciones finales seleccionadas para la extracción asistida por microondas fueron:

- ✓ Cantidad de muestra: 10 g
- ✓ Volumen de metanol: 10 ml
- ✓ Tiempo de extracción: 5 min
- ✓ Temperatura de extracción: 125°C

IX.3.1.5. Comparación entre los métodos optimizados.

Después de optimizar ambos métodos, se llevaron a cabo cinco extracciones de la misma muestra empleando cada uno de los métodos, comparándose los resultados. Los resultados obtenidos (figura IX.7) indicaban pequeñas diferencias a favor del método de ultrasonidos. Teniendo en cuenta, además, su mayor capacidad operacional, como la posibilidad de realizar más extracciones al mismo tiempo o la posibilidad de evitar el calentamiento de las muestras, el método seleccionado finalmente para la extracción de pesticidas en uvas fue el método asistido por ultrasonidos.

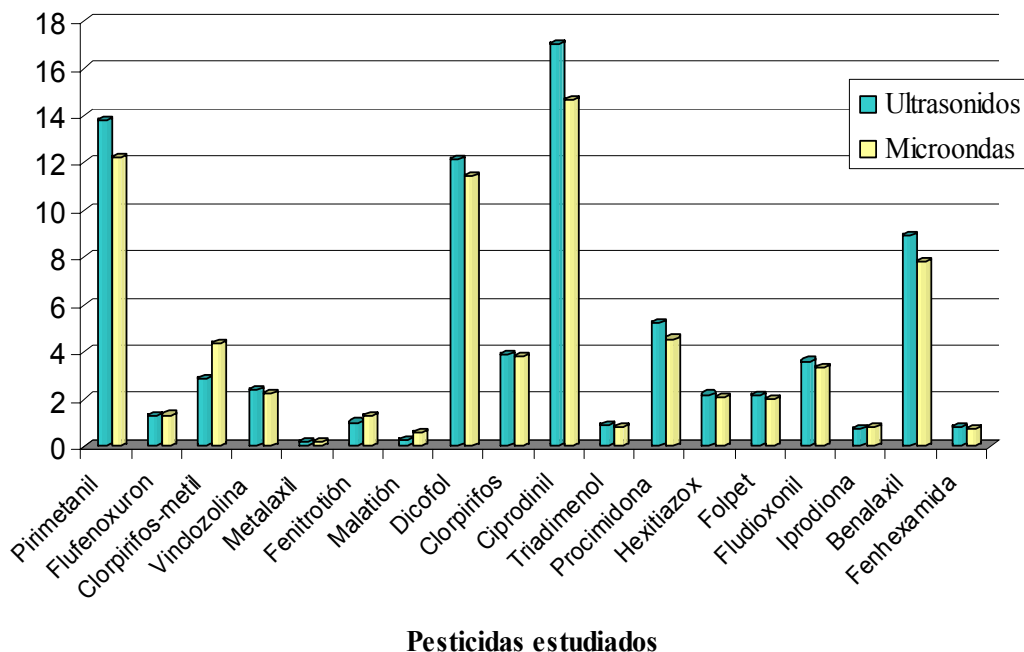


Figura IX.7. Resultados medios (n=5) obtenidos de la comparación entre el método de extracción por ultrasonidos y el método de extracción por microondas.

IX.3.2. Características analíticas.

IX.3.2.1. Calibración, linealidad y límites de detección y cuantificación.

Se le añadieron pesticidas en ocho niveles de concentración por triplicado, a cantidades de uva limpia y triturada, para realizar posteriormente el proceso de extracción completo. Se empleó para cada compuesto, la relación [pesticida/patrón interno] del área del pico del ión molecular del pesticida identificado. Los coeficientes de correlación obtenidos para cada compuesto fueron buenos ($r^2 > 0.99$), tabla IX.2.

Tabla IX.2. Características de las curvas de calibrado.

Compuesto	Rango lineal (µg/l)	r ²	Linealidad (LOL, %)	Pendiente	Ord. Orig.
Primetaniil	10.8-1080	0.9948	97.44	0.0168	-0.4904
Flufenoxuron	10.8-540	0.9932	96.28	0.0017	0.0265
Clorpirifos-metil	10.2-510	0.9915	96.22	0.0026	-0.0449
Vinclozolina	9.2-920	0.9957	97.51	0.0034	0.0089
Metalaxil	21-2100	0.9930	97.34	0.0001	0.0034
Fenitrothion	10-500	0.9947	96.73	0.0009	-0.0217
Malation	16-800	0.9946	96.98	6x10 ⁻⁵	-0.0005
Dicofol	9.4-940	0.9926	97.12	0.0183	-0.0851
Clorpirifos	8.6-860	0.9993	98.98	0.0045	-0.0305
Ciprodinil	11-825	0.9958	97.83	0.0292	-0.3763
Triadimenol	20.2-2020	0.9929	97.32	0.0007	-0.0064
Procimidona	9.8-735	0.9964	97.87	0.0111	-0.1523
Hexitiazox	10-1000	0.9942	97.45	0.0032	-0.0839
Folpet	50-1000	0.9973	97.66	0.0005	-0.0351
Fludioxonil	13-1300	0.9930	97.20	0.0045	-0.0902
Iprodiona *	21.8-1635	0.9966	97.78	0.0007	-0.0325
Benalaxil	9.6-960	0.9957	97.81	0.0126	0.1232
Fenhexamida	18-1800	0.9912	97.02	0.0008	0.0333

* Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

El rango de linealidad estudiado para cada compuesto también aparece en la tabla IX.2 y cubre los rangos de concentración esperados para los diferentes compuestos en las muestras de uva. Estos resultados también se corroboraron con la “linealidad on-line (LOL) = 100 – RSD(b)”, con valores mayores al 96% (tabla IX.2). RSD(b) es la desviación estándar relativa de la pendiente (expresada como porcentaje).

Los límites de detección y cuantificación se obtuvieron a partir del programa informático Alamin [35], empleando las curvas de calibrado construidas para cada pesticida. Los valores obtenidos (tabla IX.3) son mucho menores que los permitidos por la legislación española [36].

IX.3.2.2. Precisión. Recuperación y repetibilidad.

Para determinar la precisión del método, se realizaron estudios de recuperación y repetibilidad. Se añadieron dos concentraciones diferentes de pesticidas a diferentes muestras de uva (A y B) con diferentes contenidos de agua, para ver el posible efecto de la variación del agua durante la maduración de las uvas. Se llevó a cabo el proceso de extracción completo y se calcularon las concentraciones antes y después de las adiciones. Se calculó el porcentaje de recuperación para cada compuesto, en base a estas concentraciones (tabla IX.3). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Como se puede observar, los valores de recuperación oscilan desde el 72% al 122%, valores aceptables teniendo en cuenta que se llevan a cabo dos procesos de extracción de manera sucesiva (la extracción asistida por ultrasonidos y la SBSE). También se corrobora, a la vista de los resultados, la ausencia de posibles interferencias debido a diferentes contenidos de agua.

Tabla IX.3. Características analíticas.

Compuesto	Límite de detección (LOD, µg/l)	Límite de cuantificación (LOQ, µg/l)	Recuperación (%)		Repetibilidad (RSD, %)
			Uva A	Uva B	
Primetaniil	7.34	10.34	98.74	112.52	3.81
Flufenoxuron	8.14	11.43	74.96	80.13	19.93
Clorpirifos-metil	7.88	9.98	84.35	101.87	6.53
Vinclozolina	7.99	9.21	94.6	99.58	2.67
Metalaxil	17.54	18.99	91.22	89.61	5.25
Fenitrothion	8.87	10.12	87.39	115.13	8.42
Malation	10.34	15.87	72.81	112.09	2.95
Dicofol	7.87	9.09	82.8	82.65	8.21
Clorpirifos	6.70	8.78	102.14	118.73	5.65
Ciprodinil	8.99	10.56	112.86	121.96	6.02
Triadimenol	12.35	16.04	104.6	111.93	7.83
Procimidona	6.76	8.34	83.22	78.08	4.80
Hexitiazox	7.77	10.12	74.5	82.17	11.60
Folpet	39.96	49.12	96.73	101.23	6.68
Fludioxonil	10.03	13.45	82.48	120.73	5.92
Iprodiona *	17.45	20.56	84.39	120.34	10.14
Benalaxil	6.99	9.04	93.87	106.19	9.80
Fenhexamida	14.76	19.34	86.17	107.99	5.87

* Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

La repetibilidad se calculó mediante cinco extracciones diferentes asistidas por ultrasonidos, de cinco muestras con una cantidad de pesticida añadido conocida, empleando cinco barras agitadoras diferentes. Las desviaciones estándar relativas se muestran en la tabla IX.3, y están, en general, por debajo del 12%, lo que confirma la precisión del método. Solamente el flufenoxuron muestra valores de RSD mayores (19.93%)

IX.3.2.3. Influencia del proceso de maduración.

Tanto el contenido polifenólico de la uva como su contenido en azúcar, cambian durante el proceso de maduración. Este hecho puede afectar a los procesos de extracción de pesticidas, por tanto, se llevaron a cabo dos estudios en relación a este hecho.

Se añadieron a una muestra que contenía pesticidas añadidos, por una parte, diferentes compuestos polifenólicos (ácido gálico y ácido *p*-cumárico desde 12 mg/l hasta 0.12 mg/l; ácido vainílico, ácido protocatéquico y ácido ferúlico desde 4 mg/l hasta 0.04 mg/l; ácido cafeico desde 20 mg/l hasta 0.2 mg/l) y, por otra, diferentes cantidades de glucosa (0 g/l-150 g/l), en cinco niveles de concentración, llevándose a cabo el proceso de extracción completo, por triplicado. El RSD de los resultados obtenidos se puede observar en la tabla IX.4. Casi todos los valores (excepto el flufenoxuron) están por debajo del 15%. Estos resultados muestran que tanto el contenido polifenólico como el contenido azucarado no afectan significativamente al proceso de extracción de pesticidas y, por tanto, el método utilizado puede ser aplicado al proceso de maduración completo, para los pesticidas estudiados.

Tabla IX.4. Influencia del contenido polifenólico y azucarado en la extracción de pesticidas.

Compuesto	Estudio polifenoles (RSD, %)	Estudio azúcar (RSD, %)
Primetanil	10.92	11.17
Flufenoxuron	25.21	22.34
Clorpirifos-metil	11.12	7.15
Vinclozolina	8.53	9.37
Metalaxil	13.81	16.58
Fenitrothion	14.80	7.83
Malation	12.14	8.74
Dicofol	9.51	6.59
Clorpirifos	10.00	8.97
Ciprodinil	9.75	7.91
Triadimenol	13.96	12.29
Procimidona	10.06	12.72
Hexitiazox	9.88	5.35
Folpet	8.09	7.57
Fludioxonil	13.60	9.81
Iprodiona *	14.41	10.79
Benalaxil	13.36	9.36
Fenhexamida	10.23	9.91

* Producto de degradación: (3,5-diclorofenil)hidantoína

IX.3.3. Seguimiento de los pesticidas durante la elaboración de vinagre de Jerez.

Después de la optimización y validación del método de extracción para las uvas, se llevó a cabo el seguimiento de los pesticidas durante el proceso completo de elaboración de un vinagre de Jerez. La trazabilidad de este producto comprendió el análisis de las uvas durante la maduración, el análisis del mosto producido a partir de estas uvas durante el proceso de fermentación, el análisis del vino producido hasta que fue finalmente empleado para elaborar el vinagre y el análisis durante el proceso de fermentación acética. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se encontraron cuatro pesticidas durante el estudio de trazabilidad del vinagre: metalaxil, clorpirifos, folpet y triadimenol, siendo precisamente éstos los que fueron empleados durante el periodo de maduración. La evolución de estos compuestos durante el proceso se muestra en la figura IX.8.

Como se puede observar, en términos generales, todos los pesticidas decrecen y, en algunos casos, drásticamente, durante el periodo de maduración. El metalaxil va desde 931.91 hasta 19.52 $\mu\text{g/l}$ (el 97.90% de disminución), mientras que el clorpirifos empezó con valores de 791.37 $\mu\text{g/l}$, llegando al final de la maduración hasta valores de 19.20 $\mu\text{g/l}$ (97.57%). El resto disminuyeron pero en una forma más moderada. El folpet cayó el 64.33% (de 201.06 a 71.72 $\mu\text{g/l}$) y el triadimenol disminuyó el 74.96% (66.42-16.63 $\mu\text{g/l}$). Varios autores han obtenido disminuciones similares para estos pesticidas, debido a su degradación y transformación en otros productos [18, 37, 38].

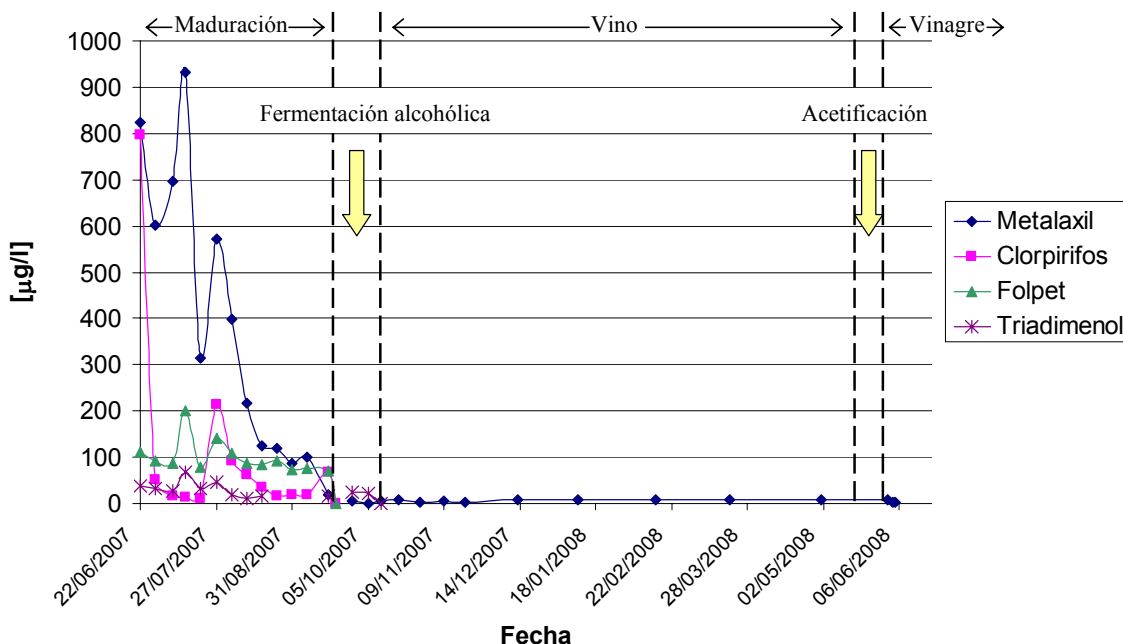


Figura IX.8. Evolución de los pesticidas durante el proceso completo de producción de vinagre

Se pueden observar algunas irregularidades en la tendencia de la degradación de los pesticidas. Este hecho se puede explicar al tener en cuenta que las muestras en el campo posiblemente no fueron afectadas en la misma forma por el tratamiento fitosanitario. Aunque el muestreo se realizó lo más representativo posible, un pequeño porcentaje de error siempre existe, pero incluso con este error experimental, la tendencia de disminución de los pesticidas se muestra claramente.

El clorpirifos y el folpet desaparecen justo con el comienzo del proceso de fermentación, mientras que el triadimenol permanece durante un par de semanas, degradándose por completo durante el transcurso del proceso de fermentación. El metalaxil disminuye con el proceso fermentativo, pero no desaparece, oscilando entre valores de 7.81 hasta 3.83 µg/l.

De estos cuatro pesticidas, el metalaxil y el triadimenol, presentan una cierta solubilidad en agua (8400 mg/l y 95 mg/l, respectivamente), mientras que, el clorpirifos y el folpet, son prácticamente insolubles. Este hecho podría explicar las pérdidas observadas al principio de la fermentación alcohólica, eliminándose estos pesticidas junto con los sólidos generados en el proceso de vinificación (levaduras muertas, hollejos, pepitas, raspón). Las disminuciones se podrían explicar también, por fenómenos de hidrólisis.

El metalaxil tampoco desapareció con la fermentación acética, encontrándose valores menores, del rango de 3.68-1.93 $\mu\text{g/l}$. Aunque este pesticida presentaba una persistencia elevada, también obtenida por otros autores [39], se encontraron valores de los residuos que son lo suficientemente bajos para consumir este producto sin ningún tipo de riesgo para la salud [36].

IX.4. Conclusiones.

Como se puede observar, es importante el disponer de métodos sensibles y fiables que permitan la determinación de la concentración de los residuos de productos fitosanitarios, debido a la alta persistencia de algunos de ellos. Esto es indispensable cuando nos enfrentamos a productos etiquetados como “ecológicos”, donde el uso de este tipo de productos está completamente prohibido por la legislación correspondiente. En este trabajo, se ha desarrollado un método de extracción asistida por ultrasonidos para pesticidas en uvas, previo al análisis mediante SBSE-GC-MS. Ha sido aplicado al estudio de la trazabilidad de los productos fitosanitarios empleados durante la producción de un vinagre de Jerez. El clorpirifos, el triadimenol y el folpet, se eliminan completamente durante la elaboración

del vinagre, mientras que el metalaxil permanece en el producto final, aunque en una concentración muy baja, segura para el consumo humano.

IX.5. Bibliografía.

- [1] C. De Liñán, “Vademecum de Productos Fitosanitarios y nutricionales”, Ediciones Agrotécnicas, 2000.
- [2] C. Sala, F. Fort, O. Busto, F. Zamora, L. Arola, J. Guasch, J. Agric. Food. Chem. 44 (1996) 3668.
- [3] H. Monteil, F. Blazy-Maugen, G. Michel, Sci. Aliments 6 (1986) 349.
- [4] J. Oliva, “Control integrado de plagas en viticultura. Influencia de los residuos de plaguicidas en la calidad de los vinos tintos obtenidos en la D.O. Jumilla” Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 1998.
- [5] F. Fort, L. Arola, F. Zamora, AEC Rev. D’enología 4 (1987) 5.
- [6] J. Ubeda, A.I. Briones, P.M. Izquierdo, Aliment. Equip. Tecnol. 15 (1996) 117.
- [7] F. Gnaegi, J. Aerny, Bull. O.I.V. 57 (1984) 57.
- [8] M.P. Quesada, “Identificación y selección de levaduras autóctonas de la Región de Murcia”, Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, 1994.
- [9] O. Zabala, M. Iñiguez, R. Ayala, P.M. Puras, Enol. Prof. 23 (1992) 82.
- [10] F. Fatichenti, A. Farris, P. Deiana, P. Cabras, M. Meloni, F.M. Pirisi, Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1984) 419.
- [11] J. García, M. Xirau, Am. J. Enol. Vitic. 45 (1994) 338.
- [12] J. Domínguez, J.L. Hernández, D. Otero, L. Pastrana, I. Pazos, Nutri-Fitos, 95 (1995) 111.
- [13] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, F.M. Pirisi, G.A. Farris, G. Madau, G. Emonti, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 3854.
- [14] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, F.M. Pirisi, F. Cabitza, M. Pala, G.A. Farris, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 6128.
- [15] J. Oliva, M.A. García, S. Navarro, A. Barba, Nutri-Fitos 71 (2000) 55.

- [16] J. Oliva, A. Barba, *Tecnol. Vino* Marzo/Abril (2002) 45.
- [17] H. Otteneder, P. Majerus, *Bull. O.I.V.* 889-890 (2005) 173.
- [18] T. Katagi, *Rev. Environ. Contam. T.* 182 (2004) 1.
- [19] S.V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin, J.-M. Chovelon, *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 33.
- [20] T. Nagayama, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 38 (1997) 270.
- [21] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, E.V. Minelli, F. Cabitza, M. Cubeddu, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2708.
- [22] E. Durán, R. Castro, R. Natera, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 144.
- [23] P. Sandra, B. Tienpont, F. David, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 299.
- [24] A. Juan-García, J. Mañes, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 119.
- [25] V.G. Zuin, M. Schellin, L. Montero, J.H. Yariwake, F. Augusto, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 180.
- [26] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [27] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 117.
- [28] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, J. Espinoza, A. Mendoza, F. Cabitza, M. Pala, V. Brandolini, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3249.
- [29] S. Navarro, A. Barba, J. Oliva, G. Navarro, F. Pardo, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 264.
- [30] S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 221.
- [31] S. Navarro, J. Oliva, G. Navarro, A. Barba, *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2001) 35.

- [32] J. Casas, “Descripción resumida de las técnicas enológicas de los vinos de Jerez” en: III Jornadas Universitarias sobre el Jerez, ed. por Jiménez-Mena, Servicio de publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz, 1985, pág. 333.
- [33] S.B. Singh, G.D. Foster, S.U. Khan, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 105.
- [34] A. Bouaid, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Cámara, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 291.
- [35] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J.L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [36] Legislación Española: BOE 125 de 23/Mayo/2008. Modificación del R.D. 280/1994.
- [37] J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, J. Bernal, L. Toribio, *Food Chem.* 104 (2007) 216.
- [38] P. Cabras, A. Angioni, V.L. Garau, M. Melis, F.M. Pirisi, G.A. Farris, A. Mendoza, C. Sotgiu, E.V. Minelli, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 476.
- [39] S. Navarro, J. Oliva, A. Barba, G. Navarro, M.A. García, M. Zamorano, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 3537.

X CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE VINAGRES DE CALIDAD CON INDICACIÓN GEOGRÁFICA EUROPEA PROTEGIDA MEDIANTE GC-MS.

X.1. Introducción.

En la Unión Europea, la promoción de alimentos tradicionalmente asociados a una determinada región geográfica, se basa en un sistema legislativo conocido como “denominación protegida” [1]. Hoy en día, la mayoría de los estados miembros poseen un número de especialidades alimentarias con Denominación de Origen Protegida (Protected Designation of Origin, PDO) o Indicación Geográfica Protegida (Protected Geographical Indication, PGI), cada uno de ellos obtenidos siguiendo especificaciones aprobadas referentes a sus propiedades químico-sensoriales, su proceso de producción y a la certificación.

En lo que respecta a los vinagres, existen dos PDO diferentes: i) Vinagre Balsámico Tradicional de Módena (VBTM) y ii) Vinagre Balsámico Tradicional de Reggio-Emilia (VBTRE) [2]. Existen otras especialidades como son el Vinagre de Jerez (VJ), producto con Denominación de Origen propia y que ha sido aceptado recientemente por la Comisión Europea como PDO [3], y el Vinagre Balsámico de Módena (VBM), el cual está bajo consideración de la Comisión Europea y su PGI está temporalmente protegida [4]. Además, en España también existen otros dos vinagres recientemente con denominaciones de origen, como son el Vinagre de Montilla-Moriles, y el del Condado de Huelva.

Recordando brevemente lo que se vio en el primer capítulo, los VBTM y VBTRE se obtienen exclusivamente del lento avinagramiento de mosto de vino cocido, gracias a las “madres” contenidas en pequeñas

barricas muy viejas de diferente tamaño. Se va retirando vinagre de la barrica más pequeña, que será rellenada de la barrica previa y así sucesivamente, hasta que la más grande se rellenará con los litros necesarios para compensar la saca y la pérdida acumulada de la evaporación de toda las barricas anteriores. Los periodos de tiempo de envejecimiento son de al menos 12 años, para el vinagre “Affinato”, o de al menos 25, para que sea etiquetado como “Stravecchio”. Por otra parte, el VBM se obtiene de la mezcla de vinagre de vino y concentrado de mosto, añadiéndole un poco de azúcar líquido y algún estabilizante, siendo un producto completamente distinto, con envejecimientos de 6 meses a 2 años. Finalmente, el vinagre de Jerez (VJ) está producido en el Marco de Jerez y procede de un vinagre de vino envejecido en barriles (botas), a menudo siguiendo el método tradicional de envejecimiento de “solera y criaderas” durante, al menos, 6 meses (Vinagre de Jerez, VJ) o 2 años (Vinagre de Jerez Reserva, VR). Hace muy poco tiempo ha parecido una nueva categoría de vinagre de Jerez envejecido como mínimo durante diez años (Gran Reserva) [3]. Los vinagres de Montilla-Moriles y del Condado de Huelva presentan un modo de elaboración similar.

Aparte de la diferente materia prima (la uva) y del área geográfica, todos estos vinagres tienen diversas similitudes en la producción y, al mismo tiempo, difieren en fases tecnológicas específicas que, de un modo general, pueden contribuir a su complejidad organoléptica y a su diversidad. Por ejemplo, todos ellos se ven sometidos a una fermentación acética y a un envejecimiento en madera (aunque en algunos casos sea de diferente duración). Por otra parte, solamente el VBM y el VJ proceden de una materia prima alcohólica (el vino) mientras que el VBTM procede de mostos parcialmente fermentados. Además, la caramelización y las reacciones de Maillard solamente ocurren en el proceso de producción del VBTM (durante

la cocción del mosto) mientras que el método de “solera” es característico tanto del VBTM como del VJ.

Sin lugar a dudas, desde un punto de vista sensorial, una de las características más importantes de estos vinagres es el impacto aromático. La composición volátil de estos vinagres ha sido objeto de diversos estudios anteriores [5-10], la mayoría de ellos llevados a cabo mediante la técnica de GC/MS. Sin embargo, debido a diferencias en el muestreo, en la extracción de la muestra y en los procedimientos analíticos, es difícil comparar los datos bibliográficos, por lo que aún hoy día falta una valoración comprensiva de la composición volátil de estos vinagres de alta calidad.

El propósito de este trabajo es, por tanto, la caracterización de la composición volátil del VBTM, VBM y VJ mediante un método de extracción en fase-sólida aplicado al análisis mediante GC/MS, y su correlación con los diferentes procesos tecnológicos aplicados.

X.2. Materiales y métodos.

X.2.1. Muestras.

Se analizaron un total de 26 muestras de vinagre: 10 muestras de VBTM (5 de la categoría “affinato” de al menos 12 años de envejecimiento y 5 de la categoría “stravecchio” de al menos 25 años); 6 muestras de VBM (de hasta 3 años de envejecimiento); y 10 muestras de VJ (4 vinagres de Jerez de al menos 6 meses de envejecimiento y 6 vinagres de Jerez Reserva de al menos 2 años)

X.2.2. Extracción de las muestras.

La extracción de las muestras se llevó a cabo siguiendo un método puesto a punto con anterioridad [11] empleando la técnica de extracción en fase sólida. Se acondicionaron cartuchos de extracción Li-Chrolut EN (200 mg, Merck, Darmstadt, Alemania) con 4 ml de diclorometano, seguidos de 4 ml de metanol y 4 ml de agua. Posteriormente, la extracción se llevó a cabo pasando 7 g de muestra, diluida 1:4 en agua Milli-Q, a una velocidad aproximada de 1.5 ml/min, a través del cartucho de SPE. Después de este paso, y sin llevar el cartucho a sequedad, se realizaba un proceso de lavado con 5 ml de agua. Con posterioridad al proceso de lavado, el cartucho se secaba mediante el paso del aire. Los compuestos eran recuperados mediante la elución con 10 ml de diclorometano. Las muestras eluidas se almacenaban a -18°C al menos durante 24 horas, para congelar el agua que contuviesen. Después, las muestras se filtraban y se añadían 100 μl del patrón interno. Finalmente, se llegaba a un volumen de 0.5 ml mediante evaporación bajo flujo de nitrógeno.

X.2.3. GC/MS.

El análisis de los extractos se llevó a cabo inyectando 2 μl en modo splitless (tiempo de splitless de 0.60 min) en un cromatógrafo de gases Thermo Finnigan Trace GC (San Jose, CA, EE.UU.) equipado con un detector de masas selectivo Thermo Finnigan Trace DSQ, un inyector microsellado MERLIN y una columna capilar de sílice fundida Stabilwax (Restek, Bellefonte, PA, EE.UU.; 30 m, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de anchura), bajo las siguientes condiciones de trabajo: helio como gas portador a un flujo de 1.0 ml/min, 62 kPa; programa de temperatura de la columna, 35°C y calentamiento a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 100°C , posteriormente calentamiento a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 240°C (mantenido durante

diez minutos). La temperatura de inyección fue de 250°C. La detección se llevó a cabo mediante impacto electrónico (EI) en modo “full scan”, empleando una energía de ionización de 70 eV y una temperatura en la línea de transferencia de 280°C. El rango de adquisición de masas fue de 30-400 uma y la velocidad de scaneo de 1 scan/s.

La identificación de los picos se llevó a cabo empleando las librerías NIST 2.0 y Wiley 7.0, mediante comparación de los espectros de masas y confirmación mediante el tiempo de retención de los patrones. Los datos cuantitativos para los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa de los picos de los iones cuantificadores en relación al del patrón interno (100 µl de una disolución de 2-octanol a 514 mg/l se añaden a 20 ml de cada muestra); el factor de respuesta de los compuestos volátiles en relación al P.I. se obtuvo experimentalmente y se aplicó para corregir el área de pico de cada analito. Para los compuestos donde faltaban los patrones, se emplearon los factores de respuesta de patrones con estructuras químicas similares.

X.2.4. Análisis estadístico.

Se sometió al conjunto completo de datos a un análisis de ANOVA seguido de un test de comparación “post hoc” (Test de Tuckey) y de un Análisis Factorial empleando el paquete de software “Statistica 6” (StatSoft, Italia).

X.3. Resultados y discusión.

X.3.1. Compuestos volátiles.

Tabla X.1. Criterios de identificación y cuantificación para compuestos encontrados en al menos una muestra de vinagre.

#	LRI ⁽¹⁾	Compuesto	Nombre común	Cuantificación ⁽²⁾	Identificación ⁽³⁾	Casa comercial ⁽⁴⁾
1	1142	1-butanol		56	S, MS	Aldrich
2	1208	3-metil-1-butanol	alcohol isoamílico	55+70	S, MS	Merck
3	1240	hexanoato de etilo		88	S, MS	Sigma
4	1246	3-hidroxi-3-metil-2-butanona		59	S, MS	Sigma
5	1265	dihidro-2-metil-3(2H)-furanona		NQ	MS	
6	1279	acetato de hexilo		43	S, MS	Aldrich
7	1286	3-hidroxi-2-butanona	acetoína	43+45	S, MS	Sigma
8	1348	lactato de etilo		45	S, MS	Sigma
9	1360	4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	alcohol diacetílico	59	S, MS	Sigma
10	1379	3-etoxi-1-propanol		59+71	S, MS	Aldrich
11	1389	3-acetiloxi-2-butanona		NQ	MS	
12	1407	tetradecano		85+71	S, MS	Aldrich
13	1443	óxido de linalool isómero 1		59	S, MS	Fluka
14	1469	2-furaldehído	furfural	95+96	S, MS	Sigma
15	1472	óxido de linalool isómero 2		59	S, MS	Fluka
16	1497	diacetato de butanodiol isómero 1		TIC	MS	
17	1507	2-acetilfurano	2-furilmetil cetona	95+110	S, MS	Sigma
18	1521	benzaldehído		105+106	S, MS	Fluka
19	1524	3-hidroxi-butarato de etilo		43	S, MS	Aldrich
20	1534	diacetato de butanodiol isómero 2		TIC	MS	
21	1547	ácido propanoico		73+74	S, MS	Sigma
22	1555	diacetato de 1,2-etanodiol		43+86	S, MS	Fluka
23	1567	5-metil-2-furaldehído	5-metil furfural	109+110	S, MS	Sigma
24	1577	ácido isobutírico		TIC	MS	
25	1594	δ-valerolactona		TIC	MS	

Tabla X.1. (continuación). Criterios de identificación y cuantificación para compuestos encontrados en al menos una muestra de vinagre.

#	LRI ⁽¹⁾	Compuesto	Nombre común	Cuantificación ⁽²⁾	Identificación ⁽³⁾	Casa comercial ⁽⁴⁾
26	1597	dihidro-4-metil-2(3H)-furanona		NQ	MS	
27	1601	2-acetil-5-metilfuranona		TIC	MS	
28	1611	dihidro-2(3H)-furanona	γ -butirolactona	42+86	S, MS	Fluka
29	1617	2-acetoxi-1-propanol		TIC	MS	
30	1627	ácido butanoico		60	S, MS	Fluka
31	1654	diacetato de propanodiol isómero 1		TIC	MS	
32	1661	2-furanmetanol	alcohol furfurílico	82+97	S, MS	Fluka
33	1667	ácido 4-hidroxi-3-pentanoico γ -lactona	angelicalactona	98+55	S, MS	Aldrich
34	1670	3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona		TIC	MS	
35	1673	ácido isopentanoico	ácido isovalérico	60	S, MS	Sigma
36	1673	succinato de dietilo		101+129	S, MS	Sigma
37	1687	γ -hexalactona	caprolactona	85	S, MS	Aldrich
38	1725	acetato de bencilo		TIC	MS	
39	1742	diacetato de propanodiol isómero 2		TIC	MS	
40	1748	ácido pentanoico	ácido valérico	60+73	S, MS	Aldrich
41	1768	salicilato de metilo		120	S, MS	Sigma
42	1774	1-(5-metil-2-furil)-2-propanona		NQ	MS	
43	1780	2-fenilacetato de etilo		164	S, MS	Fluka
44	1786	5-valerolactona		TIC	MS	
45	1791	butoxietoxietanol		75	S, MS	Aldrich
46	1818	acetato de 2-feniletilo		104	S, MS	Aldrich
47	1839	2-hidroxi-3-metil-2-ciclopenten-1-ona	cicloteno*	TIC	MS	
48	1870	ácido hexanoico	ácido caproico	60+73	S, MS	Aldrich
49	1875	2-metoxifenol	guaiacol	109+124	S, MS	Sigma
50	1898	<i>trans</i> -4-metil-5-butildihidro-2(3H)-furanona	<i>trans</i> -whiskeylactona	99	S, MS	Aldrich

Tabla X.1. (continuación). Criterios de identificación y cuantificación para compuestos encontrados en al menos una muestra de vinagre.

#	LRI ⁽¹⁾	Compuesto	Nombre común	Cuantificación ⁽²⁾	Identificación ⁽³⁾	Casa comercial ⁽⁴⁾
51	1899	alcohol bencílico		79+108	S, MS	Aldrich
52	1903	diacetato de 1,4-butanodiol		TIC	MS	
53	1925	2-feniletanol	alcohol fenético	91+122	S, MS	Fluka
54	1948	5-etoximetil-2-furaldehído		TIC	MS	
55	1967	<i>trans</i> -4-metil-5-butildihidro-2(3H)-furanona	<i>cis</i> -whiskeylactona	99	S, MS	Fluka
56	1975	3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona	maltol	126	S, MS	Aldrich
57	1996	2,5-furandicarboxaldehído		TIC	MS	
58	2019	1-(2-furanil)-2-hidroxietanona	furilhidroximetil cetona	TIC	MS	
59	2027	4-metil-5,6-dihidropiran-2-ona	lactona deshidromevalónica	TIC	MS	
60	2044	1H-pirrol-2-carboxaldehído		TIC	MS	
61	2047	4-etil-2-metoxifenol	p-etilguaiacol	137+152	S, MS	Sigma
62	2051	dihidro-3-hidroxi-4,4-dimetil- 2(3H)-furanona	pantalactona	71	S, MS	Fluka
63	2061	3-acetoxipropeno	acetato de alilo	TIC	MS	
64	2064	malato de dietilo		117	S, MS	Sigma
65	2082	5-etoxidihidro-2(3H)-furanona	solerona	TIC	MS	
66	2092	ácido octanoico		60+73	S, MS	Sigma
67	2103	triacetato de 1,2,3-propanotriol	triacetin	43	S, MS	Aldrich
68	2110	4-metilfenol		TIC	MS	
69	2185	2-metoxi-4-(2-propenil)fenol	eugenol	164	S, MS	Sigma
70	2198	4-etilfenol		107+122	S, MS	Sigma
71	2215	5-acetoximetil-2-carboxaldehído	acetoxymethyl furfural	126	S, MS	Aldrich
72	2244	diacetato de 1,2,3-propanotriol		TIC	MS	
73	2271	monoacetato de 1,2,3-propanotriol		TIC	MS	
74	2272	2,6-dimetoxifenol	siringol	139+154	S, MS	Fluka
75	2275	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	ddmp	TIC	MS	

Tabla X.1. (continuación). Criterios de identificación y cuantificación para compuestos encontrados en al menos una muestra de vinagre.

#	LRI ⁽¹⁾	Compuesto	Nombre común	Cuantificación ⁽²⁾	Identificación ⁽³⁾	Casa comercial ⁽⁴⁾
76	2283	ácido decanoico		60+73	S, MS	Sigma
77	2295	3,5-dihidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona	5-hidroximaltol	TIC	MS	
78	2328	4-(1-hidroxietil)gamma-butanolactona		NQ	MS	
79	2404	hidrogenosuccinato de etilo		101	S, MS	Sigma
80	2455	ácido benzoico		105+122	S, MS	Sigma
81	2467	ácido 2-furanocarboxílico	ácido 2-furónico	95+112	S, MS	Sigma
82	2509	5-hidroximetil-2-furaldehído	HMF	97+126	S, MS	Sigma
83	2519	5-acetil-2-furanometanol		NQ	MS	
84	2567	4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído	vainillina	151+152	S, MS	Sigma
85	2574	ácido fenilacético		91+136	S, MS	Aldrich
86	2658	4-hidroxi-3-metoxibenzoato de etilo	vainillato de etilo	196	S, MS	Aldrich
87	2667	1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)etanona	acetovainillona	151	S, MS	Aldrich
88	2722	ácido tetradecanoico*		TIC	MS	
89	2786	4-hidroxi-3-metoxifeniletanol	alcohol homovainillílico	TIC	MS	
90	2827	ácido hexadecanoico		73+129	S, MS	Sigma
91	2854	4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído	siringialdehído	181+182	S, MS	Aldrich
92	2864	4-hidroxibenzaldehído*		TIC	MS	
93	2925	4-hidroxifenil etanol	tirosol	107	S, MS	Sigma

(1) = Índices lineales de retención

(2) = Fragmentos de masa empleados para la cuantificación (TIC implica el uso del área de pico adquirido en modo TIC; NQ implica no cuantificación)

(3) = Identificación obtenida a partir de patrones (S) y/o espectro de masas (MS)

(4) = Casa comercial del patrón

Los compuestos volátiles identificados en los vinagres se muestran en la tabla X.1.

Se identificaron un total de 93 compuestos en al menos una de las muestras de vinagre, 57 de los cuales fueron confirmados mediante comparación con los tiempos de retención y espectros de masas de patrones comerciales. Para los compuestos volátiles restantes, las identificaciones fueron llevadas a cabo utilizando sus espectros de masas con las bibliotecas Nist 2.0 y Wiley 7, confirmándolos después mediante la comparación con los índices de retención lineales (linear retention indexes, LRI) encontrados en la bibliografía.

Desde un punto de vista general, las cantidades de alcoholes encontradas en las muestras estaban bastante en concordancia con otros trabajos sobre el VBTM [5, 6], VBM, [6, 7] y VJ [6, 8-10] (tabla X.2).

Si se comparan con los VBM y VJ, en los VBTM se encuentran, en general, una menor cantidad de estos compuestos, probablemente debido a la ausencia casi total de fermentación alcohólica durante las fases de producción de estos últimos. Esto se hace particularmente evidente en el caso del 3-metil-1-butanol y, en menor medida, en los casos del 2-feniletanol y del tirosol, que proceden típicamente del metabolismo de los aminoácidos de las levaduras durante la fermentación alcohólica [12]. Y tal y como encontraron Zeppa y col. [5], además, el 3-metil-1-butanol disminuye con el avance del proceso de envejecimiento, siendo mayor en el VBM (donde el periodo medio de envejecimiento es más corto), y menor en las dos clases comerciales de VJ. Se muestra una tendencia similar para los alcoholes bencílico y homovainillílico, donde fueron menores en VBTM que en VBM y VJ.

Tabla X.2. Cuantificación ($\mu\text{g/l}$) de los compuestos aromáticos en los vinagres analizados. Alcoholes y aldehídos.

compuesto	VBT Affinato			VBT stravecchio			VBM			VJ			VR							
	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max					
Alcoholes																				
1-butanol	-	n.d.	n.d.	-	n.d.	n.d.	Loq	n.d.	7.45	Loq	n.d.	1.39	Loq	n.d.	10.65					
3-metil-1-butanol (mg/l)	0.53	0.02	16.6	a	0.10	0.00	0.79	a	56.21	25.61	77.46	c	27.01	15.62	37.08	b	25.83	14.73	48.44	b
3-etoxi-1-propanol	68.5	55.4	391		103	26.4	438		242	141	1084		239	177	307		276	163	1600	
2-acetoxi-1-propanol ¹	30.8	17.6	83.6		53.8	47.7	148		38.6	16.1	59.7		31.4	23.5	39.2		42.2	40.3	86.8	
butoxi-etoxietanol	141	72.4	276	b	120	18.8	373	b	29.1	22.1	47.3	a	25.9	21.1	46.5	a	41.3	20.0	93.0	ab
alcohol bencílico	177	81.6	292	a	342	231	510	a	576	443	1106	b	656	524	849	b	1079	848	1532	c
2-feniletanol (mg/l)	8.65	3.55	9.89	a	14.12	8.14	35.3	ab	18.2	13.3	28.7	ab	17.9	14.3	21.2	ab	21.8	15.9	29.8	b
alcohol homovainillílico ²	75.9	41.4	80.6	a	87.4	84.2	110	a	138	90.2	232	ab	345	286	486	b	253	112	830	b
tirosol (mg/l)	8.17	5.71	16.9	a	18.0	12.0	32.9	a	11.6	7.19	27.1	ab	45.2	25.0	54.7	b	30.2	12.2	85.2	b
<i>Suma alcoholes (mg/l)</i>	<i>18.4</i>	<i>13.2</i>	<i>26.0</i>	<i>a</i>	<i>30.8</i>	<i>23.7</i>	<i>70.2</i>	<i>a</i>	<i>88.1</i>	<i>48.1</i>	<i>132</i>	<i>b</i>	<i>90.6</i>	<i>65.3</i>	<i>107</i>	<i>b</i>	<i>90.8</i>	<i>44.0</i>	<i>145</i>	<i>b</i>
Aldehídos																				
benzaldehído	9.47	4.82	11.2	a	8.87	4.86	15.3	a	15.8	9.77	23.4	a	61.2	17.5	110	ab	71.5	63.4	198	b
vainillina	967	399	1161	b	1476	1248	4810	b	192	43.0	625	a	1039	700	3317	b	1537	1165	2821	b
siringialdehído	887	233	1982	ab	1568	1440	6313	ab	185	n.d.	792	a	3133	2984	8849	b	3409	1585	6684	b
4-hidroxibenzaldehído ³	45.1	20.9	80.5		82.7	54.2	119		18.5	9.88	32.3		55.8	48.1	292		89.4	64.2	226	
<i>Suma aldehídos (mg/l)</i>	<i>1.94</i>	<i>0.70</i>	<i>3.05</i>	<i>ab</i>	<i>3.13</i>	<i>2.82</i>	<i>11.2</i>	<i>b</i>	<i>0.42</i>	<i>0.06</i>	<i>1.44</i>	<i>a</i>	<i>4.25</i>	<i>3.83</i>	<i>12.6</i>	<i>b</i>	<i>5.23</i>	<i>3.03</i>	<i>9.80</i>	<i>b</i>

En la misma fila, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$). n.d.: por debajo del límite de detección; Loq: por debajo del límite de cuantificación. Los siguientes compuestos están expresados como: ¹ 3-etoxi-1-propanol; ² vainillina; ³ benzaldehído

Tabla X.2. (continuación). Cuantificación ($\mu\text{g/l}$) de los compuestos aromáticos en los vinagres analizados. Ácidos.

compuesto	VBT Affinato			VBT stravecchio			VBM			VJ			VR							
	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max					
Ácidos																				
ácido propanoico	502	128	837	a	397	309	636	a	2143	1283	4107	b	3164	2028	4296	bc	4573	3425	6337	c
ácido isobutírico ⁴	600	272	1606	a	737	638	1748	a	1358	816	2442	a	2775	2243	3105	b	3749	3560	4775	c
ácido butírico	196	67.2	353	a	200	129	489	a	724	535	2372	a	1400	1264	4263	ab	3459	1593	8069	c
ácido isovalérico (mg/l)	8.42	0.98	35.5	a	16.0	4.01	24.9	a	17.4	11.0	36.7	a	110	75.2	154	b	151	139	218	c
ácido pentanoico	24.7	4.50	54.3	a	31.5	26.1	77.0	a	74.4	44.6	142	a	132	115	161	ab	367	188	1156	b
ácido hexanoico	350	117	990	a	561	307	988	a	1522	862	2452	b	2336	1871	2768	b	3255	2766	3966	c
ácido octanoico	63.1	Loq	382	a	210	101	1197	a	1325	518	2434	b	1748	1258	2745	b	2065	1577	2420	b
ácido decanoico	Loq	Loq	10.3	a	10.7	Loq	136	a	79.3	7.26	129	a	156	56.7	409	ab	165	97.4	386	b
ácido tetradecanoico ⁵	52.6	6.48	77.9		67.0	51.6	265		58.4	15.1	133		127	86.0	217		98.4	30.6	166	
ácido hexadecanoico	395	85.9	669		547	286	1497		492	227	922		1835	871	10886		715	173	1890	
ácido fenilacético	2506	955	2713	ab	3537	2795	5332	ab	913	583	2999	a	3897	3172	8627	bc	6381	3607	8733	c
ácido benzoico	1757	479	3646	a	4673	1650	5411	a	476	246	1183	a	3311	2376	11795	ab	8804	5530	13642	b
<i>Suma ácidos (mg/l)</i>	<i>15.4</i>	<i>8.13</i>	<i>44.2</i>	<i>a</i>	<i>30.5</i>	<i>13.6</i>	<i>33.4</i>	<i>a</i>	<i>27.7</i>	<i>16.3</i>	<i>52.3</i>	<i>a</i>	<i>134</i>	<i>94.3</i>	<i>192</i>	<i>b</i>	<i>195</i>	<i>168</i>	<i>260</i>	<i>b</i>

En la misma fila, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$). n.d.: por debajo del límite de detección; Loq: por debajo del límite de cuantificación. Los siguientes compuestos están expresados como: ⁴ ácido butírico; ⁵ ácido decanoico

Tabla X.2. (continuación). Cuantificación ($\mu\text{g/l}$) de los compuestos aromáticos en los vinagres analizados. Ácetatos y derivados enólicos.

compuesto	VBT Affinato			VBT stravecchio			VBM			VJ			VR							
	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max					
Acetatos																				
acetato de hexilo	6.87	Loq	33.65	2.25	Loq	25.12	16.01	9.21	109.94	25.97	12.35	76.38	50.37	19.34	75.13					
diacetato de butanodiol Isómero ¹ ⁶	Loq	Loq	36.6	2.73	n.d.	69.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.55					
diacetato de butanodiol Isómero ² ⁶	Loq	Loq	72.5	22.7	4.16	149	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8.38	Loq	31.6					
acetato de 1,2-etanodiol	Loq	Loq	5.75	Loq	n.d.	33.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.					
diacetato de propanodiol Isómero 1 ⁶	76.6	30.6	368	a	341	229	458	a	574	103	799	a	368	243	431	a	995	582	1589	b
acetato de benzilo	6.86	Loq	16.3	a	11.7	8.94	31.4	a	18.9	6.63	29.5	a	22.5	16.3	28.7	a	59.3	46.3	68.8	b
diacetato de propanodiol Isómero 2 ⁶	349	158	1673	a	811	462	1160	a	3291	1139	4766	b	2033	1761	2270	ab	3232	2349	6335	b
acetato de 2-feniletilo	693	279	2189		1599	746	4999		1812	1169	2241		1642	1123	1892		2364	2111	5086	
diacetato de 1,4-butanodiol ⁶	40.6	30.8	67.0	ab	136	111	231	b	31.3	11.1	80.4	a	29.4	19.0	67.6	a	62.4	32.3	87.6	a
acetato de alilo	27.8	9.21	63.1	ab	63.2	61.2	187	b	Loq	n.d.	19.1	a	3.93	Loq	12.7	ab	18.2	2.49	61.9	ab
triacetin	15.2	Loq	84.8	b	112	79.4	351	c	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a	Loq	n.d.	0.03	a
diacetato de 1,2,3-propanotriol ⁶	670	485	1891		2465	1232	4867		681	282	1273		882	733	1155		1323	1040	2264	
monoacetato de 1,2,3-propanotriol ⁶	43.1	19.2	169		240	97.2	519		37.5	Loq	117		65.8	48.6	88.8		113	75.3	203	
<i>Suma acetatos (mg/l)</i>	<i>2.61</i>	<i>1.14</i>	<i>4.83</i>	<i>a</i>	<i>5.97</i>	<i>3.38</i>	<i>12.3</i>	<i>ab</i>	<i>6.82</i>	<i>3.62</i>	<i>6.99</i>	<i>ab</i>	<i>5.08</i>	<i>4.47</i>	<i>5.49</i>	<i>ab</i>	<i>8.14</i>	<i>6.79</i>	<i>13.42</i>	<i>b</i>
Derivados enólicos																				
3-etil-2-hidroxi-2-ciclopenten-1-ona ⁷	21.6	15.3	97.3	ab	42.3	21.1	126	b	6.7	n.d.	9.6	a	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a
cicloteno ⁷	198	100	269	bc	300	249	457	c	181	Loq	514	b	Loq	Loq	76.9	a	6.86	Loq	36.5	a
maltol	462	317	611	ab	1003	791	1417	b	111	73.8	275	a	83.9	45.4	123	a	178	99.1	311	a
5-hidroxi-maltol ⁷	585	174	1989		1003	743	2654		360	169	1533		96.6	20.9	1025		234	175	2050	
<i>Suma derivados enólicos (mg/l)</i>	<i>1.36</i>	<i>0.69</i>	<i>2.72</i>	<i>ab</i>	<i>2.55</i>	<i>2.19</i>	<i>3.85</i>	<i>b</i>	<i>0.61</i>	<i>0.25</i>	<i>1.96</i>	<i>a</i>	<i>0.18</i>	<i>0.07</i>	<i>1.22</i>	<i>a</i>	<i>0.40</i>	<i>0.31</i>	<i>2.35</i>	<i>a</i>

En la misma fila, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$). n.d.: por debajo del límite de detección; Loq: por debajo del límite de cuantificación. Los siguientes compuestos están expresados como: ⁶ triacetin; ⁷ maltol

Tabla X.2. (continuación). Cuantificación ($\mu\text{g/l}$) de los compuestos aromáticos en los vinagres analizados. Ésteres, derivados furánicos y piránicos

compuesto	VBT Affinato			VBT stravecchio			VBM			VJ			VR							
	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max					
Ésteres																				
hexanoato de etilo	Loq	n.d.	18.2	n.d.	n.d.	Loq	n.d.	n.d.	n.d.	Loq	Loq	6.35	6.43	Loq	20.7					
lactato de etilo	126	Loq	366	a	10.0	1.86	379	a	3209	770	11925	b	1698	979	19427	b	3681	427	8166	b
3-hidroxibutirato de etilo	51.9	10.2	368		168	113	661		99.4	89.1	145		147	65.9	168		188	138	283	
succinato de dietilo	Loq	Loq	21.4	a	n.d.	n.d.	Loq	a	635	100	1915	b	823	181	1366	b	194	61.6	689	ab
2-fenilacetato de etilo	2.09	Loq	24.0	a	Loq	Loq	29.2	a	3.82	Loq	34.4	a	88.3	63.5	236	b	207	108	368	b
salicilato de metilo	5.02	1.34	15.7	a	5.06	1.41	30.5	a	20.4	14.3	67.2	ab	32.8	19.6	37.7	ab	57.7	27.8	76.8	b
malato de dietilo	n.d.	n.d.	n.d.		loq	loq	249		n.d.	n.d.	n.d.		Loq	Loq	78.5		n.d.	n.d.	n.d.	
hidrogenosuccinato de etilo (mg/l)	0.14	Loq	6.94	a	Loq	Loq	18.6	a	85.7	42.5	193	b	145	60.0	182	b	99.0	16.1	131	b
vainillato de etilo	16.5	3.57	28.8		37.2	19.9	119		56.0	1.39	130		117	96.4	147		96.6	47.0	228	
<i>Suma ésteres (mg/l)</i>	<i>0.71</i>	<i>0.04</i>	<i>7.02</i>	<i>a</i>	<i>0.33</i>	<i>0.15</i>	<i>20.0</i>	<i>a</i>	<i>90.8</i>	<i>50.9</i>	<i>199</i>	<i>b</i>	<i>157</i>	<i>60.6</i>	<i>185</i>	<i>b</i>	<i>103</i>	<i>16</i>	<i>140</i>	<i>b</i>
Derivados furánicos y piránicos																				
5-metil-2-furaldehído	4436	2499	5224	bc	3894	2150	6664	c	1229	716	3081	ab	Loq	Loq	962	a	51.6	Loq	487	a
furfural (mg/l)	75.2	40.0	76.7	b	54.3	38.5	90.2	b	9.12	2.74	41.7	a	1.82	1.38	5.88	a	5.12	3.66	21.6	a
2-acetilfurano	802	396	1790	ab	767	428	2422	b	631	238	842	ab	60.1	13.4	254	a	164	110	519	a
2-acetil-5-metilfurano ⁸	Loq	Loq	1092		33.8	12.1	246		Loq	n.d.	13.1		n.d.	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	3.38	
2-furanometanol	118	94.4	149	ab	147	122	248	ab	264	90.8	713	b	44.3	7.78	88.2	a	1.65	1.65	198	a
5-etoximetil-2-furaldehído ⁸	Loq	n.d.	122	ab	153	Loq	2647	b	Loq	Loq	165	a	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a
2,5-furanodicarboxaldehído ⁹	1778	680	2439	c	1934	1404	3586	c	227	153	680	b	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a
furilhidroximetil cetona ⁸	2544	Loq	6362	ab	4178	2406	9504	b	1888	Loq	7985	ab	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a
1H-pirrol-2-carboxaldehído ⁹	283	155	518	b	433	180	567	b	351	216	555	b	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a
5-acetoximetil-2-furaldehído (mg/l)	89.6	54.8	97.4	b	215	103	271	b	loq	n.d.	9.29	a	n.d.	n.d.	n.d.	a	n.d.	n.d.	n.d.	a
ddmp ⁷	273	125	292	b	298	131	331	b	392	259	1052	b	10.5	10.5	43.2	a	10.5	10.5	39.1	a
ácido 2-furanocarboxílico	1167	901	2339	ab	3854	2889	4679	b	858	262	2328	a	1504	1228	2154	ab	2112	1766	2907	ab
5-hidroximetil-2-furaldehído (mg/l)	1614	728	2308	b	2055	1456	2782	b	646	427	931	ab	11.5	4.46	51.8	a	12.9	0.69	46.3	a
<i>Suma compuestos furánicos (mg/l)</i>	<i>1773</i>	<i>886</i>	<i>2466</i>	<i>c</i>	<i>2388</i>	<i>1689</i>	<i>3117</i>	<i>c</i>	<i>659</i>	<i>430</i>	<i>1001</i>	<i>b</i>	<i>15.1</i>	<i>7.51</i>	<i>60.2</i>	<i>a</i>	<i>19.9</i>	<i>6.86</i>	<i>70.9</i>	<i>a</i>

En la misma fila, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$). n.d.: por debajo del límite de detección; Loq: por debajo del límite de cuantificación. Los siguientes compuestos están expresados como: ⁷ maltol; ⁸ 2-acetil furano; ⁹ ácido furoico

Tabla X.2. (continuación). Cuantificación ($\mu\text{g/l}$) de los compuestos aromáticos en los vinagres analizados. Cetonas, lactonas, fenoles y terpenos

compuesto	VBT Affinato			VBT stravecchio			VBM			VJ			VR							
	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max	mediana	min	max					
Cetonas																				
acetovainillona	102	63	173	267	161	431	124	107	157	263	247	607	336	180	765					
3-hidroxi-3-metil-2-butanona	19.8	10.3	28.0	18.0	12.0	32.2	38.3	19.6	186	30.8	25.0	91.1	75.3	26.6	270					
3-hidroxi-2-butanona (acetoina)	322	Loq	1702	a	102	Loq	623	a	5960	1786	14997	b	6992	1789	11042	b	5039	2399	9654	b
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	241	38	522	217	196	304	198	66	335	181	167	249	244	130	527					
<i>Suma cetonas (mg/l)</i>	<i>0.77</i>	<i>0.43</i>	<i>2.06</i>	<i>a</i>	<i>0.66</i>	<i>0.59</i>	<i>1.25</i>	<i>a</i>	<i>6.42</i>	<i>1.98</i>	<i>15.6</i>	<i>b</i>	<i>7.66</i>	<i>2.32</i>	<i>11.5</i>	<i>b</i>	<i>6.150</i>	<i>2.972</i>	<i>10.00</i>	<i>b</i>
Lactonas																				
5-valerolactona ¹⁰	43.7	34.4	61.7	ab	70.2	41.5	99.3	b	23.0	16.9	34.7	a	18.4	13.8	32.7	a	33.3	18.5	76.7	ab
caprolactona	14.9	4.72	33.0	b	54.8	29.2	172	c	14.9	Loq	26.6	a	18.1	7.41	31.6	b	64.1	30.6	99.3	c
<i>trans</i> -whiskeylactona	Loq	Loq	7.12	a	2.23	Loq	428	a	1.22	Loq	12.6	a	139	124	167	b	115	22.6	157	b
<i>cis</i> -whiskeylactona	17.0	7.04	43.0	ab	46.7	35.1	551	b	Loq	Loq	0.1	a	22.3	6.88	26.5	ab	27.2	Loq	33.5	ab
lactona deshidromevalónica ¹⁰	412	291	1033	ab	1588	1356	3406	b	181	97.8	367	a	193	109	382	a	470	320	828	a
pantalactona	1461	420	1911	ab	2569	2454	2895	b	1189	637	2433	b	592	397	1418	a	1122	740	2297	a
solerona ¹⁰	234	105	286	ab	403	305	622	b	101	80.6	178	a	97.7	65.0	155	a	122	91.0	171	a
δ -valerolactona ¹⁰	127	85.5	257		268	168	711		63.4	45.4	463		62.8	60.6	76.1		107	79.4	234	
γ -butirolactona	713	422	858		1368	946	2325		1086	569	2043		666	269	713		616	462	1188	
angelicalactona ¹⁰	567	391	635	bc	924	702	1377	c	612	89.2	1100	bc	160	64.3	424	ab	69.1	4.7	107	a
<i>Suma lactonas (mg/l)</i>	<i>4.50</i>	<i>2.91</i>	<i>5.22</i>	<i>a</i>	<i>8.35</i>	<i>7.67</i>	<i>12.8</i>	<i>b</i>	<i>4.49</i>	<i>3.13</i>	<i>7.27</i>	<i>a</i>	<i>3.37</i>	<i>3.18</i>	<i>4.04</i>	<i>a</i>	<i>4.71</i>	<i>4.29</i>	<i>6.50</i>	<i>a</i>
Fenoles																				
siringol	22.5	19.5	26.5		25.7	24.8	30.4		24.6	22.6	27.6		20.9	18.3	21.5		18.8	18.0	24.7	
guaiacol	6.1	3.2	6.5		6.8	5.7	12.43		7.50	4.86	9.85		6.37	5.47	9.38		9.84	6.31	14.1	
p-etilguaiacol	8.31	0.00	22.8	a	8.93	3.82	37.1	a	92.6	30.8	137	b	149	75.2	237	b	141	105	176	b
4-metilfenol ¹¹	12.0	8.55	14.6		21.5	15.1	38.6		5.53	5.02	7.34		12.9	11.0	21.0		14.5	11.7	82.0	
eugenol	5.02	2.67	8.13		8.09	2.41	23.5		2.67	1.44	3.70		6.49	3.77	7.22		6.30	5.17	7.40	
4-etilfenol	47.1	38.9	89.7	a	89.0	57.4	206.3	ab	190	17.0	283	b	237	143	249	b	199	142	249	b
<i>Suma fenoles</i>	<i>105</i>	<i>82.3</i>	<i>160</i>	<i>a</i>	<i>162</i>	<i>127</i>	<i>320</i>	<i>ab</i>	<i>321</i>	<i>116</i>	<i>452</i>	<i>ab</i>	<i>430</i>	<i>266</i>	<i>542</i>	<i>b</i>	<i>401</i>	<i>318</i>	<i>471</i>	<i>b</i>
Terpenos																				
óxido de linalool Isómero1	5.35	0.00	7.49	a	7.2	0.0	21.0	a	35.1	12.7	50.3	b	12.8	10.9	18.9	a	28.3	25.1	40.5	ab
óxido de linalool Isómero2	4.90	0.00	8.60	a	5.98	1.89	9.54	a	18.1	6.45	23.4	b	7.56	5.09	9.30	a	19.1	14.3	22.3	b

En la misma fila, las diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,01$). n.d.: por debajo del límite de detección; Loq: por debajo del límite de cuantificación.

Los siguientes compuestos están expresados como: ¹⁰ γ -butirolactona; ¹¹guaiacol

Los aldehídos pueden proceder de las oxidaciones de los alcoholes o del aporte de la madera. Se encontraron diferencias significativas entre los vinagres para el benzaldehído, siringialdehído y la vainillina, siendo este último el mayor en VBTM y VJ con envejecimientos largos. Callejón y col. encontraron cantidades similares de vainillina [7] y no consideraron VBTM en su trabajo. Es bastante sorprendente que Zeppa y col. [5] no encontraran vainillina o siringialdehído en tres baterías diferentes de VBTM.

En los vinagres, los ácidos proceden principalmente de la oxidación de los alcoholes, causada por las bacterias acéticas. Por tanto, su presencia se espera que esté relacionada con las cantidades de alcoholes de la materia prima. En base a los datos de los ácidos, en total fueron significativamente superiores en VJ y VR, mientras que para VBTM y VBM se obtuvieron las concentraciones menores. Este hecho es particularmente evidente para los ácidos de cadena corta (C3-C6) que eran estadísticamente los más concentrados en VR (puede que debido a su proceso de producción más largo con respecto a VJ).

El ácido isovalérico representa, con mucho, al ácido principal en los vinagres (hasta aproximadamente el 80% del total en VJ) y su concentración en VJ y VR es ligeramente superior a la obtenida en anteriores trabajos [10] o por otros autores [7, 8]. En VBM y VBTM, sin embargo, los datos obtenidos concuerdan bastante bien con Callejón y col.s [7] y Zeppa y col. [5], respectivamente.

Los acetatos se forman por la esterificación entre el ácido acético y los mono o polialcoholes y se espera que se incrementen con la duración del proceso de envejecimiento [5]. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias leves entre los vinagres al tener en cuenta la suma de los acetatos (tabla X.2). Por el contrario, teniendo en cuenta cada éster por separado, se puede

observar que VR presentaba las mayores cantidades de los acetatos de propanodiol y de bencilo, mientras que VBTM contenía las cantidades más altas de diacetato de butanodiol y de triacetin. Este último compuesto parecía ser característico de VBTM y su cantidad diferenciaba el VBTM “affinato”, más joven, del VBTM “stravecchio” más envejecido. Cuantitativamente, Natera y col. [9], Durán y col. [10] y Callejón y col. [7], en VJ y VBM respectivamente, obtuvieron cantidades similares de acetatos de bencilo y de 2-feniletilo. Los acetatos provenientes de dioles o trioles, solamente fueron encontrados por Zeppa et al. [5] en VBTM, en rangos de concentración menores.

Los ésteres etílicos son otra familia de compuestos que ya ha sido descrita en vinagres. Sus cantidades se han correlacionado significativamente con el contenido de etanol de la materia prima [8]. De hecho, como suma, los vinagres provenientes de matrices alcohólicas (VBM, VJ y VR) presentaban las cantidades mayores de ésteres etílicos, mientras que para ambos VBTM (affinato y stravecchio), se obtuvieron las menores. Una buena parte de esta diferencia se debe al hidrogenosuccinato de etilo (que es el éster etílico mayoritario en todos los vinagres). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre VBTM y todos los demás vinagres también para lactato de etilo, succinato de dietilo, salicilato de metilo y 2-fenilacetato de etilo. Este último compuesto en particular, parece ser característico de los vinagres españoles (tabla X.2). Los datos confirman los resultados de otros autores [13] quienes, en un estudio mediante SLDA, apuntaron que a la hora de diferenciar el aroma de vinagres balsámicos, de Jerez, de vino y de sidra, el 2-fenilacetato de etilo y el salicilato de metilo estaban entre las variables más discriminatorias. En términos cuantitativos, de nuevo los datos concuerdan con estudios previos ([5, 7-10] para VBTM, VBM y VJ respectivamente), y confirman que aquellos ésteres fuertemente relacionados con la fermentación alcohólica, tales como el succinato de

dietilo y el malato de etilo, estaban presentes casi exclusivamente en el VBM, VJ y VR.

Se ha sugerido que las α -dicetonas cíclicas de 5 ó 6 miembros con sustituyentes alquílicos, tales como el maltol y los compuestos relacionados, exhiben un aroma típico de madera de arce dulce y azúcar quemado, y que esta propiedad puede ser debida a su forma cetona-enólica estable [14, 15]. Estos compuestos surgen típicamente de la degradación, o bien térmica, o bien catalizada por ácidos, de las hexosas [15] y algunos de ellos han sido descritos en alimentos o bebidas como el café [16] o los vinos de Jerez [17]. Además, su presencia también fue puesta de manifiesto en las maderas tostadas empleadas para el envejecimiento de los vinos y vinagres [18] como consecuencia de la degradación pirolítica de la celulosa. En lo que respecta al vinagre, Zeppa y col. [5] describieron la presencia de algunos derivados enólicos (maltol, cicloteno, 5-hidroxi-maltol) en VBTRE, mientras que Callejón y col. [7, 8] identificaron una furanona con una estructura enol-carbonílica (Sotolon) en VJ de gran envejecimiento.

Como se muestra en la tabla X.2, los datos sugieren que el VBTM posee las mayores cantidades de derivados enólicos en comparación con VBM y VJ. El 5-hidroxi-maltol fue el principal contribuyente de esta clase de compuestos, seguido del maltol y el cicloteno. Según las publicaciones conocidas, este es el primer trabajo donde se describe la presencia de cicloteno en VBM y VJ. Además, es de destacar que para este último compuesto, el umbral de percepción en agua se encuentra alrededor de los 0.3 mg/l [19], pudiendo contribuir de manera importante a la complejidad aromática del VBTM.

Ninguna de las muestra reveló la presencia de sotolon, puede que por la relativamente baja recuperación, de este compuesto del método empleado.

Un compuesto enólico más (3-etil-2-hidroxiciclopenten-2-ona) se identificó exclusivamente para los vinagres balsámicos italianos. Se puede considerar el homólogo etílico del cicloteno y posee un elevado impacto aromático dulce a azúcar quemado, con un umbral de percepción notablemente más bajo que este último compuesto [15]. Las mayores cantidades de derivados enólicos en VBTM con respecto a VJ y VBM pueden derivar de la cocción inicial del mosto y del prolongado envejecimiento en madera de este producto rico en azúcar. Por otra parte, las bajas cantidades de 3-etil-2-hidroxiciclopenten-2-ona en BVM pueden deberse a la práctica admitida de la adición de caramelo.

Otras clases de volátiles que se originan a partir de la degradación térmica de los azúcares son los compuestos furánicos y tiránicos. De hecho, un gran número de ellos se han descrito después del calentamiento de disoluciones de glucosa, en su mayoría con la presencia de aminoácidos [20, 21]. Por otra parte, se sabe que el VBTM muestra una cantidad relevante de HMF y de furfural, junto con otros derivados furánicos tales como el 2-acetilfurano y el ácido furoico [22].

Como cabía esperar, ambos tipos de VBTM presentaban la mayor cantidad de compuestos furánicos (Tabla X.2) independientemente de la edad del vinagre. El VBM mostraba un menor, aunque relevante, contenido total de furanos (probablemente procedente de la adición de caramelo), mientras que los VJ tenían el menor contenido de estos derivados de azúcares. El HMF era, con mucho, el más representativo (hasta el 93.5% en VBTM “affinato”) seguido del furfural y 5-metilfurfural. En VBTM, el 5-

acetoximetilfurfural es también un compuesto mayoritario procedente de la esterificación entre el ácido acético y el HMF. Este volátil, descrito en VBTM con concentraciones que van desde 7.28 [5] hasta 188 mg/kg [22], parece ser característico de los VBTM italianos y podría representar un parámetro discriminante entre el VBTM “affinato” y el “stravecchio”, como ya han sugerido Giacco y col. [23].

Se encontraron tres volátiles adicionales exclusivamente en VBTM y VBM. Estos eran el 2,5-furanodicarboxaldehído, la furilhidroximetil cetona y el 1H-pirrol-2-carboxaldehído. Todos ellos pueden derivar de las reacciones de Maillard producidas al calentar mezclas de prolina o fenilalanina [24] y se han encontrado en extractos de roble tostado [18, 25]. Su impacto sensorial se ha descrito como “miel” y “caramelo tostado” [25] y, en VBTM y VBM pueden derivar de la cocción del mosto y de la adición de caramelo respectivamente.

Otros derivados furánicos relevantes son el 2-acetil-5-metilfurano, con una reminiscencia a nueces, y la DDMP, cuyo papel en el camino de Maillard ha sido descrito como de pivote para la generación de derivados enólicos (5-hidroximaltol, maltol y cicloteno en particular) [20].

La acetoína es un constituyente del vino inicialmente producido durante la fermentación alcohólica. Su cantidad en el vinagre aumenta por la transformación de α -acetolactato y 2,3-butanodiol debido a la bacteria acética [26]. A pesar de la baja recuperación que el método de extracción usado mostró para este compuesto [11], los datos demostraron que los vinagres que provenían del vino tenían la mayor cantidad de este compuesto, que está caracterizado por un olor a mantequilla. La concentración media de acetoína que se observa en la tabla X.2 para VBM y VJ ronda los 6 mg/Kg, pero se ha descrito la acetoína como uno de los compuestos volátiles

mayoritarios en VJ, con concentraciones en el rango de los gramos por litro [10].

Se han encontrado cantidades considerables de lactonas que pueden proceder de la ciclación de los hidroxiacidos durante la fermentación o de la degradación de los azúcares [5].

Por otra parte, en las whiskeylactonas, que están relacionadas con el envejecimiento en madera, la relación entre los dos isómeros se piensa que depende de las especies de madera empleadas [27]. Sorprendentemente, y contrariamente a lo encontrado por otros autores [7], la relación cis/trans encontrada en los VJ fue menor que 1 (puede que por el uso prolongado de botas viejas de roble americano), mientras que en el VBTM esa relación oscila entre 2 y 20, probablemente como consecuencia del uso de diferentes especies de madera (castaño, enebro, morera) cuya relación cis/trans es bastante desconocida.

Los fenoles volátiles eran mayores en los VJs. Su presencia en los vinagres se debe al envejecimiento en madera (este es el caso del guaiacol, siringol y eugenol) o a la descarboxilación biológica de los ácidos cinnámicos, provocada por la bacteria *Brettanomyces* o maloláctica (etilfenol y etilguaiacol). Como demuestran los datos, se encontraron diferencias significativas en el contenido de etilfenol entre los vinagres derivados del vino y los VBTM, probablemente por la intervención de la fermentación bacteriana en los vinos iniciales. En lo que concierne a los fenoles derivados de la madera, sus cantidades eran casi las mismas en todos los tipos de vinagre. Este hecho está parcialmente en contradicción con otros autores [7], que encontraron la mayor concentración de guaiacol en BVM (hasta 300 µg/l) pero cantidades similares de eugenol en VJ, BVM y

vinagres de vinos tintos, lo que sugiere que la presencia de estos compuestos es independiente de la duración del envejecimiento en madera.

X.3.2. Análisis Factorial.

Para obtener una representación comprensible de los principales volátiles que pudiera diferenciar las muestras de vinagre, se llevó a cabo un análisis factorial al conjunto de los datos obtenidos.

En la figura X.1 se muestra la localización de las 26 muestras en el espacio formado por los dos primeros factores (56% de la varianza).

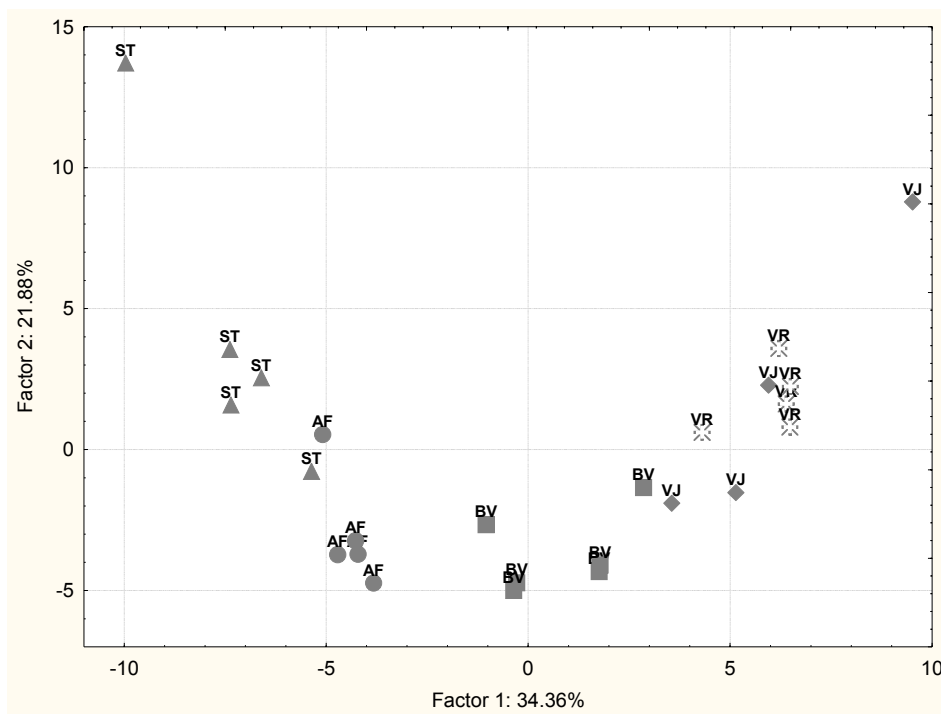


Figura X.1. PCA. Gráfico de los dos primeros componentes principales.
AF= VBTM Affinato; ST= VBTM Stravecchio; BV= VBM; VJ=Vinagre de Jerez; VR=Vinagre de Jerez Reserva

Se discriminan claramente cuatro grupos de muestras en el factor 1, VBTM “Stravecchio”, VBTM “Affinato”, VBM y VJs respectivamente. Aparece por tanto, que las dos categorías de VJs (Vinagre de Jerez y Reserva) casi no se discriminan entre ellas para este factor, cuyos parámetros principales fueron los ácidos propanoicos y hexanoico, p-etilguaiacol y alcohol bencílico (con signo positivo) y 5-hidroximetil-2-furaldehído (con signo negativo).

Es interesante destacar que la única muestra de Vinagre de Jerez que pudo ser discriminada (en la parte superior derecha del gráfico) fue la de vinagre de Pedro Ximenez.

El factor 2 discriminaba tanto al VBTM “stravecchio” como a los VJ del VBTM “affinato” y del VBM. Los parámetros que explicaban principalmente esta varianza fueron la caprolactona, el 3-hidroxibutirato de etilo y el diacetato de 1,2,3-propanotriol.

En general, los datos obtenidos demuestran que los factores que podrían influenciar al impacto aromático de los vinagres analizados son el material de partida (vino o mosto); la duración de la acetificación o envejecimiento en madera; y el procedimiento tecnológico que pudiera producir una degradación importante de los azúcares. Los ácidos carboxílicos de cadena corta, los compuestos furánicos y los acetatos fueron capaces de discriminar los tres vinagres de alta calidad estudiados.

X.4. Bibliografía.

- [1] http://ec.europa.eu/agriculture/foodqual/quali1_en.htm
- [2] Reg. CE n° 813 del 20 de marzo del 2000

- [3] Orden de 5 de Septiembre de 2008. BOJA nº. 184 de 16 de Septiembre de 2008, pág. 29.
- [4] <http://www.politicheagricole.it/ProdottiQualita/ProdottiDop/default.htm>
- [5] G. Zeppa, M. Giordano, V. Gerbi, G. Meglioli, *Ital. J. Food Sci.* 14 (2002) 248.
- [6] A. Del Signore, *J. Food Eng.* 50 (2001) 77.
- [7] R. M. Callejón, M. L. Morales, A. C. Silva Ferreira, A. M. Troncoso, *J. Agric. Food Chem.* (56) 17 (2008) 8086.
- [8] R. M. Callejón, M. L. Morales, A. M. Troncoso, A. C. Silva Ferreira, *J. Agric. Food Chem.* (56) 15 (2008) 6631.
- [9] R. Natera, R. Castro, M. V. García, F. García, C. G. Barroso, *J. Chrom. A* 967 (2002) 261.
- [10] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C. G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 18.
- [11] E. Durán Guerrero, F. Chinnici, N. Natali, R. Natera, C. Riponi, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3030.
- [12] J. H. Swiegers, E. J. Bartowsky, P. A. Henschke, I. S. Pretorius, *Austr. J. Grape Wine Res.* 11 (2005) 139.
- [13] C. Pizarro, I. Esteban-diez, C. Saenz-González, J.M. González-Saiz, *Ana. Chim. Acta* 608 (2008) 38.
- [14] H. Tateba, S. Mihara, *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990) 2271.
- [15] A. Pittet, P. Rittersbacher, R. Muralidhara, *J. Agr. Food Chem.* 18 (1970) 929.
- [16] P. Friedel, V., Krampl, T. Radford, J. A. Renner, F. W. Shephard, M. A. Gianturco, *J. Agr. Food Chem.* 19 (1971) 530.
- [17] J. A. Moreno, L. Zea, L. Moyani, M. Medina, *Food Chem.* 16 (2005) 333.
- [18] N. Natali, F. Chinnici, C. Riponi, *J. Agr. Food Chem.* 54 (2006) 8190.
- [19] <http://www.leffingwell.com/burnt.htm>.

- [20] M. Kim, W. Baltes , J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 282.
- [21] I. Cutzach, P. Chatonnet, R. Henry, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 2217.
- [22] F. Chinnici, F. Masino, A. Antonelli, J. Chrom. Sci. 41 (2003) 305.
- [23] M. Giacco, A. del Signore, Riv. Merceol. 36 (1997) 91.
- [24] W. Baltes, L. Mevissen, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 187 (1988) 209.
- [25] I. Cutzach, P. Chatonnet, R. Henry, D. Dubourdieu, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 1663.
- [26] T. Asai. “Acetic Acid Bacteria”. 1968 University Tokio press, Tokyo.
- [27] A. L. Waterhouse, J. P. Towey, J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 1971.

XI FORMACIÓN, ENTRENAMIENTO Y VALIDACIÓN DEL PANEL DE CATA PARA LA EVALUACIÓN SENSORIAL DE VINAGRES.

XI.1. Introducción.

Durante siglos la única manera de medir la calidad de un alimento fue a través de los sentidos, pero con el desarrollo de la instrumentación y las técnicas analíticas, la percepción sensorial fue perdiendo terreno frente a otras medidas de laboratorio. De ahí que, en muchas ocasiones, la calidad de un producto se defina por sus características físicas, químicas y microbiológicas. La gran hipótesis es que manteniendo al producto dentro de este tipo de especificaciones, tendrá a su vez características sensoriales adecuadas. Pero hay ingredientes y procesos que tienen un efecto sinérgico que no se puede medir con instrumentos.

Mientras la medida de las características físicas, químicas y microbiológicas se llevan a cabo mediante métodos en la línea más clásica del método científico, podría pensarse que la evaluación de las propiedades sensoriales es algo subjetivo, impensable de considerar en un estudio riguroso del alimento. Pero esto no corresponde con la realidad. La evaluación sensorial es, si se diseña y ejecuta correctamente, una disciplina científica, pues definido un objetivo, la metodología para conseguirlo se basa en el planteamiento de una hipótesis y el diseño de los experimentos que generen datos cuantitativos reproducibles, de cuya interpretación es posible extraer conclusiones. Además, el análisis sensorial utiliza conocimientos de fisiología de los sentidos, de química, tecnología de los alimentos, estadística y otras ramas de la ciencia.

Se define pues el *análisis o evaluación sensorial* como la disciplina científica empleada para medir e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos u otras sustancias, tal como se perciben a través de los sentidos de la vista, el olfato, el tacto, el gusto y el oído.

El instrumento de análisis en la evaluación sensorial es el *juez*. Existen cuatro tipos de jueces, diferenciados por su dominio o nivel de formación en la materia (experto, entrenado o catador, semientrenado o de laboratorio y consumidor). Los objetivos que se persigan determinaran el tipo de juez y su número. En el estudio realizado, se ha trabajado con un panel de 6-10 jueces pertenecientes al personal del departamento de Química Analítica, que se reunieron semanalmente en sesiones de 2-3 horas hasta conseguir el dominio necesario para llevar a cabo pruebas discriminativas y descriptivas sencillas. Para su selección y entrenamiento se siguieron los criterios contemplados en la norma UNE 87024-1 para jueces de laboratorio y entrenados.

XI.2. Selección.

La participación de personas para medir propiedades sensoriales es análoga al uso de cualquier instrumento para medir parámetros químicos. El instrumento se selecciona por su capacidad para proveer la medida deseada lo más exacta y consistentemente posible. En este sentido, la selección se realiza con el fin de eliminar antes del entrenamiento a los voluntarios no aptos para la evaluación sensorial. Los aspectos a valorar son: disponibilidad, interés por el proyecto, limitaciones de salud, características relevantes de la personalidad y aptitud sensorial.

Como se ha comentado, los jueces pertenecen al personal de laboratorio. En el primer contacto se repartió el *Cuestionario 1* cuya

plantilla se muestra, con el objeto de obtener información general sobre los candidatos y los hábitos que pudieran tener alguna repercusión en el trabajo como evaluadores. Asimismo, se expusieron los objetivos del proyecto y la programación prevista, además de las normas necesarias para el buen funcionamiento del panel (puntualidad, limitación del consumo de tabaco y café en la hora anterior a las sesiones, evitar perfumes, etc.)

Durante las primeras sesiones, se aseguró que los candidatos comprendían las pruebas y los cuestionarios, que se repitieron para determinar la reproducibilidad de sus respuestas. Se realizaron pruebas de selección para:

- *Determinar la agudeza sensorial* mediante pruebas de emparejamiento (UNE 87016) de estímulos olfativos (punzante, pegamento) y gustativos (punzante) (*Cuestionario 2*) y de determinación de umbrales (UNE 87003) de detección e identificación en boca (sacarosa) y nariz (acético) (*Cuestionario 3*). En las pruebas de emparejamiento se presentaron las disoluciones de referencia (ácido acético y acetato de etilo; ácido acético y sacarosa) en vinagre sintético, codificadas, en cantidades suficientes para familiarizarse con los estímulos. A continuación se mostraron 5 disoluciones, solicitándose que, de percibirse equivalencia, se emparejaran con alguna de las muestras de referencia. Adicionalmente, se introdujo a los jueces en el procedimiento de evaluación de sustancias olorosas, en la importancia de la concentración y del trabajo individual, y en la necesidad de utilizar un protocolo idéntico en la evaluación de cada muestra.
- *Evaluación del potencial de los candidatos para describir y comunicar las percepciones vía nasal*, mediante evaluación

individual y posterior discusión. Se utilizaron vinagres elaborados a partir de distintas materias primas (vino blanco, vino tinto, manzana) y procedentes de diferentes orígenes geográficos y elaboraciones (Jerez, Módena), y se solicitaba a los jueces que describieran tanto los caracteres (atributos) comunes como las diferencias entre las muestras (*Cuestionario 4*).

Junto con los datos generales recopilados y los resultados de las pruebas, para la selección y continuidad de cada juez se tuvo en cuenta más que el comportamiento inicial su potencial, así como la confirmación durante un breve periodo de tiempo de las características que lo capacitan como tal.

XI.3. Entrenamiento.

Los jueces han de ser calibrados para estandarizar medidas que puedan ser reproducidas e interpretadas. Para ello, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones generales:

- Se acostumbró a los jueces a controlar hábitos tales como el tabaco, café, perfumes, jabones, etc., justo antes de las sesiones, y a que comuniquen incidencias como resfríos, medicación eventual, etc.
- Respecto al protocolo, se les instó a proceder en toda ocasión de una manera establecida, esto es, leyendo primero atentamente el cuestionario, realizando un nº limitado de inhalaciones, haciendo uso de los tiempos de descanso aconsejados entre dos muestras, etc.
- Se utilizaron muestras, escalas, pruebas e instrumentos que posteriormente se usarían en las pruebas con los vinagres objeto de estudio.
- Se realizó un seguimiento de los avances y la reproducibilidad de las valoraciones de cada juez.

Los jueces participaron en tareas de entrenamiento específico, con el fin de reconocer los atributos sensoriales seleccionados como de mayor interés, aquellos que con mayor frecuencia contribuyeron a describir los vinagres en la prueba de evaluación del potencial descriptivo. Estos fueron: punzante, pegamento, plátano, manzana, roble, tostado, regaliz, afrutado, floral, caramelo, pasa, dulce, balsámico.

El entrenamiento inicial de los jueces tuvo como objetivo, por un lado el manejo de los utensilios y pruebas, así como el reconocimiento de los descriptores útiles. Para ello, se utilizaron adiciones de sustancias aromáticas o maceraciones de productos naturales, en primer lugar en solución hidroacética al 6%, y posteriormente sobre un vinagre neutro (*Cuestionario 5*). Cuando algún juez demostró incapacidad para el reconocimiento de alguno de los atributos, se descartaron estos datos en el tratamiento final.

El entrenamiento en escalas de intensidad se realizó mediante pruebas de ordenamiento (UNE 87023) de 5 puntos, que para cada estímulo utilizado cubría el rango de intensidad en el que posteriormente se encontrarían las muestras reales. Estos puntos de las escalas se construyeron por adición de sustancias patrón sobre un vinagre neutro. En las prueba de ordenamiento se les pide a los jueces que pongan las muestras en orden creciente o decreciente de intensidad del estímulo (*Cuestionario 6*). Es una prueba sencilla y rápida, y con un sencillo tratamiento de datos. Los resultados se comentaban tras cada sesión, dando a los jueces la oportunidad de volver a examinar las muestras para verificar sus resultados allí donde erraron. De esta forma, los jueces construían en su mente una escala estructurada de 5 puntos, de intensidades equivalentes a *ausente, débil, débil, media, pronunciada y muy pronunciada*, para cada uno de los atributos utilizados (punzante, roble, pegamento, plátano).

Aún con el entrenamiento realizado, durante las evaluaciones de las muestras del proyecto se continuó evaluando la reproducibilidad de cada uno de los jueces, de manera que cuando los resultados no alcanzaron los mínimos exigidos, se eliminaron del estudio estos datos. Además, los análisis de la varianza de cada atributo incluido en las pruebas descriptivas permitieron estudiar la homogeneidad del panel. En función de éstos, en algunos casos se observó discrepancia entre las puntuaciones de un solo juez respecto de la del resto del panel, descartándose en tal caso su juicio en los descriptores afectados.

XI.4. Cuestionarios empleados.

Cuestionario 1

ENCUESTA PRELIMINAR PARA LA CONSTITUCIÓN DEL PANEL DE CATA DE VINAGRE

Información general:

Nombre:

Edad:

Teléfono:

Correo electrónico:

Por favor, responda las **cuestiones** siguientes:

1. ¿Padece alguna alergia, o tiende tendencia a padecer enfermedades respiratorias tipo resfríos, bronquitis, etc.?
2. ¿Está realizando alguna dieta?
3. ¿Fuma? De ser afirmativa la respuesta, haga una estimación del nº de cigarrillos diarios.
4. Señale tres medios días a lo largo de la semana, en que previsiblemente esté disponible o los prefiera para participar en sesiones de cata.
5. ¿Es consumidor de vinagres? En tal caso, indique periodicidad.
6. Observaciones y sugerencias:

GRACIAS

Cuestionario 2

PRUEBA: SENSIBILIDAD OLFATIVA

Huele las 2 muestras de referencia que se presentan, procurando memorizar las sensaciones que percibes. Si identificas el estímulo, anota de qué se trata, y si no, intenta describirlo:

A continuación huele las 5 muestras siguientes, de izquierda a derecha, y especifica en la tabla adjunta con cuál de las dos primeras coincide cada una.

Muestra	Coincide con referencia de código

GRACIAS

PRUEBA: SENSIBILIDAD GUSTATIVA

Prueba las 2 muestras de referencia que se presentan, procurando memorizar las sensaciones que percibes. Si identificas el estímulo, anota de qué se trata, y si no, intenta describirlo:

A continuación prueba las 5 muestras siguientes, de izquierda a derecha, y especifica en la tabla adjunta con cuál de las dos primeras coincide cada una.

Muestra	Coincide con referencia de código

GRACIAS

Cuestionario 3

PRUEBA SENSIBILIDAD OLFATIVA

Recibirás un set de 8 muestras numeradas del 1 al 8.

Huele la primera por la izquierda y continúa hacia la derecha.

Anota en la tabla:

- 0 No percibido
- X Sensación diferente al agua
- XX Percibe el olor. Definirlo.

1	2	3	4	5	6	7	8

GRACIAS

PRUEBA SENSIBILIDAD GUSTATIVA

Tienes un set de 8 muestras, numeradas del 1 al 8.

Prueba la primera muestra por la izquierda y continúa hacia la derecha, sin enjuagar la boca.

Anota en la tabla:

- 0 No percibido
- X Percibido diferente al agua
- XX Percibe el gusto. Definirlo

Enjuagar la boca antes de continuar con el segundo set.

1	2	3	4	5	6	7	8

GRACIAS

Cuestionario 4

PERFIL DE LIBRE ELECCIÓN DE VINAGRES

1. Se presentarán **3 pares de muestras de vinagres** para evaluar (pares n^{os} 1, 2 y 3).
2. Huele la primera pareja, anota sus códigos y describe las notas **que permiten diferenciar** las muestras **y también aquellas otras que tienen en común**, especificando en este caso las intensidades relativas.
3. Procede a continuación de la misma forma con las otras dos parejas.

Códigos	Descriptorios

GRACIAS

Cuestionario 5

ENTRENAMIENTO EN IDENTIFICACIÓN DE OLORES EN VINAGRE

1. Estarán disponibles 7 frascos de olores en vinagre.
2. Por favor destape el primer frasco
3. Huela en su interior e inmediatamente vuelva a cerrarlo.
4. Escriba su código y los descriptores que a su juicio definen el olor
5. Espere por lo menos 30 s antes de abrir otro frasco.
6. Puede volver a oler el interior de los frascos las veces que considere necesario.

Códigos	Descriptores

GRACIAS

Cuestionario 6

ORDENAMIENTO DE ESTÍMULO OLOROSO

1. Recibirás un set de 5 muestras.
2. Huele la primera por la izquierda y continúa hacia la derecha.
3. Cuando las hayas olido todas, coloca en la tabla inferior sus códigos, en orden creciente de intensidad del estímulo “roble”

Intensidad estímulo	Menos				Más
Código Muestra					

GRACIAS

XII ESTUDIOS DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO EMPLEANDO MICROOXIGENACIÓN Y VIRUTAS, EN LA PRODUCCIÓN DE UN VINAGRE DE JEREZ.

XII.1. Introducción.

El envejecimiento en madera es una práctica usualmente empleada en Enología con el fin de proporcionar al producto joven ciertas características, tanto organolépticas como fisicoquímicas, que lo transforma en otro de mayor calidad y más apreciado por el consumidor. Sin embargo, es un proceso lento y costoso. En el caso del Vinagre de Jerez, el producto debe ser envejecido un mínimo de seis meses en barricas de roble americano, pudiendo llegar hasta los diez años [1]. Durante este proceso, fundamentalmente dos factores entran en juego de manera conjunta. Por un lado el contacto del producto con la madera de la bota y, por otro lado, gracias a la porosidad de ésta, la difusión de oxígeno al interior, en pequeñas cantidades. Este proceso podría ser imitado y acelerado de manera artificial mediante el empleo conjunto de virutas de roble con microoxigenación.

El empleo de virutas de roble para acelerar el proceso, es una práctica ampliamente utilizada en la enología para el caso de los vinos, y existen diversos trabajos donde se estudia su influencia sobre diferentes parámetros como son el contenido antociánico, contenido polifenólico, color, y las características sensoriales [2-7]. Para el caso del Vinagre de Jerez, se han realizado varios estudios a escala de laboratorio, donde se ha investigado la influencia de la adición de virutas, como propuesta de envejecimiento acelerado, en el contenido volátil, contenido polifenólico y en el perfil organoléptico [8-12], obteniéndose interesantes resultados.

Por otra parte, la técnica enológica conocida como microoxigenación, consiste en la aplicación de oxígeno en forma de microburbujas, inyectándolas mediante el empleo de un microdifusor [13]. Desde su invención en 1993 [14], ha sido empleada ampliamente en vinos tintos [15-29] debido a que con su uso se favorece la estabilización de la materia colorante, así como la suavización de la astringencia inicial, entre otros aspectos [30]. Sin embargo, no ha sido empleada nunca con anterioridad en vinagres, como complemento al procedimiento de envejecimiento acelerado anteriormente indicado.

De esta forma, con el fin de emular y acelerar el proceso natural de envejecimiento en botas de roble, se ha propuesto un procedimiento innovador de envejecimiento acelerado para vinagres de Jerez, donde se emplean, de manera complementaria y simultánea, las virutas de roble y la técnica de microoxigenación, siendo desarrollado a nivel industrial en una bodega de la zona. Para el control del proceso se ha realizado el seguimiento de los compuestos volátiles mediante un método desarrollado con anterioridad por nuestro grupo de investigación [31, 32], de los componentes polifenólicos, del color mediante los parámetros CIELab, además del análisis sensorial llevado a cabo por un panel de catadores expertos.

Según la bibliografía consultada, sería el primer trabajo donde se emplean de manera conjunta estas dos técnicas (virutas + microoxigenación) aplicadas el envejecimiento acelerado de vinagres, además de estar realizado a escala industrial.

XII.2. Materiales y métodos.

XII.2.1. Diseño de las experiencias.

Para realizar el estudio se empleó un vinagre denominado “vinagre apto” (variedad Palomino Fino), etiqueta empleada en los vinagres que se designan para fabricar Vinagre de Jerez. Para realizar las experiencias se utilizaron depósitos con capacidad para 5000 litros de vinagre y con una altura mayor a los 2 m, altura mínima recomendada para asegurar la completa disolución del oxígeno aplicado. Se llevaron a cabo dos experiencias consecutivas, cada una de las cuales englobaba a su vez cinco experimentos diferentes llevados en paralelo. En estos experimentos los vinagres fueron sometidos a maceración con virutas de madera a la vez que se le aplicaba oxígeno para imitar el procedimiento natural de envejecimiento en botas de madera. Además, se realizó simultáneamente un experimento de envejecimiento tradicional en una bota jerezana de 50 litros. La tabla XII.1 muestra las condiciones empleadas en las diferentes experiencias.

Tabla XII.1. Condiciones empleadas en las experiencias de envejecimiento acelerado.

Experiencia	Tanque n°	Virutas (g/l)	Oxígeno (ml/l/mes)
1	1	0	0
	2	2	0
	3	2	3
	4	2	10
	5	2	25
	Bota	Envejecimiento tradicional	
2	1	0	0
	2	5	0
	3	5	10
	4	5	40
	5	5	70
	Bota*	Envejecimiento tradicional	

*: Continuación de la experiencia anterior

La duración de las dos experiencias fue de 46 días cada una, decidiéndose su duración en función de las evaluaciones sensoriales que se realizaron paralelamente durante el desarrollo de las experiencias. El experimento de envejecimiento tradicional se mantuvo constante durante el desarrollo de las dos experiencias, por lo que su duración fue de 92 días.

Tanto el equipo de microoxigenación, DosiOx modelo MDX, como las virutas empleadas, de roble americano tostado (*Quercus alba*), fueron suministrados por Productos Agrovín (Alcázar de San Juan, España).

Se tomaron muestras dos veces por semana de los depósitos durante las experiencias, mientras que la bota fue muestreada una vez semanalmente hasta el final del proceso.

XII.2.2. Compuestos volátiles.

Los compuestos volátiles se determinaron mediante SBSE y cromatografía gaseosa. El método de SBSE había sido optimizado previamente para la determinación de este tipo de compuestos en vinagres [31, 32].

De manera breve, las extracciones se llevaron a cabo empleando barras agitadoras de PDMS comerciales de 10 mm x 0.5 mm (longitud x anchura) suministradas por Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany). Se emplearon 25 ml de muestra, 5.85 g de cloruro sódico y 50 µl de una disolución de 4-metil-2-pentanol (2.27 g/l en agua Milli-Q conteniendo 80 g/l de ácido acético). La barra agitadora se agitó a 1250 rpm durante 120 minutos a 25°C. Las barras agitadoras fueron desorbidas térmicamente en una unidad de desorción térmica comercial TDS-2 (Gerstel) conectado a un inyector CIS-4 de vaporización a temperatura programada (PTV) (Gerstel)

mediante una línea de transferencia de calor. Se realizaron análisis mediante GC-MS capilar en el modo de impacto electrónico empleando un sistema Agilent 6890 GC-5973N MS (Agilent, Little Falls, DE, EE.UU.), equipado con una columna capilar DB-Wax (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.), 60 m x 0.25 mm d.i., con un recubrimiento de 0.25 μm . El detector de masas operó en modo EI+ a 70eV en un rango de 30 a 400 amu.

La identificación de los picos se llevó a cabo usando la librería Wiley por analogía con los espectros de masas. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa del ion molecular de cada compuesto, en relación a la del 4-metil-2-pentanol, el patrón interno.

XII.2.3. Compuestos polifenólicos.

El análisis de los compuestos polifenólicos se llevó a cabo empleando un sistema Waters Acquity UPLCTM (Waters Corp., Milford, EE.UU.) acoplado a un sistema de detección de fotodiodo array. Se empleó una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm D.I., con 1.7 μm de tamaño de partícula) suministrada también por Waters. La temperatura de la columna se mantuvo a 47 °C. El sistema binario de fases fue el siguiente: Fase A: 3% de acetonitrilo, 2% de ácido acético, 95% de agua; Fase B: 85% de acetonitrilo, 2% de ácido acético, 13% de agua. El flujo empleado fue de 0.7 ml/min, con una presión posterior máxima de 10400 psi, la cual está dentro de las posibilidades del UPLC. El volumen de inyección fue de 2.5 μl . El gradiente empleado de 6.5 min fue el siguiente: 0 min. 100% A, 3 min. 90% A (curva 6), 4 min. 90% A, 6.5 min. 25% A (curva 6). Finalmente la columna se lavó con 100% de B durante 3 minutos y se equilibró con 100% de A durante otros 3 minutos.

La identificación de cada compuesto se llevó a cabo comparando los tiempos de retención y los espectros UV-Vis de los picos en el vinagre con aquellos obtenidos previamente mediante la inyección de patrones.

XII.2.4. Análisis del color.

Todas las muestras fueron sometidas a medición de su espectro UV-vis, cada 10 nm, en el intervalo de 380-770 nm, empleando un espectrofotómetro Helios Gamma (Unicam, Cambridge, Reino Unido) para posterior cálculo de los parámetros CIELab. Como iluminante se utilizó el D65 con un ángulo de observación de 10°.

XII.2.5. Análisis sensorial.

Las sesiones se realizaron en una sala de cata normalizada, donde se minimiza la influencia de estímulos externos en los juicios emitidos. Se presentaron en todos los casos 15 ml de muestra en catadora de aceite con tapa, para evitar la influencia del color en el juicio y se realizó exclusivamente evaluación del olor por vía nasal.

Los jueces, pertenecientes todos al personal de laboratorio, tuvieron un periodo de entrenamiento en aspectos generales y específicos, durante el cual se evaluó la repetibilidad de sus juicios y la homogeneidad del panel. Adicionalmente, los duplicados de las pruebas discriminativas y descriptivas del estudio se utilizaron para validar la reproducibilidad de los jueces, mientras que para cada descriptor, los ANOVAs de dos factores (JuecesxMuestras ó JuecesxSemanas) permitieron estudiar la homogeneidad del panel. En algunos casos se observó discrepancia entre las puntuaciones de un solo juez respecto de la del resto del panel, descartándose en tal caso su juicio en los descriptores afectados

Se realizaron dos tipos de pruebas.

a) Triangular (UNE 87006). Su objetivo fue detectar diferencias entre pares de muestras y, opcionalmente, determinar el sentido de la diferencia. Para ello, se presentaron a los jueces tres muestras, de las cuales dos eran iguales, y se les pedía que identificaran la muestra diferente (ver anexo XII.1 al final del capítulo). Se amplió el esquema básico de la prueba, interrogando a los jueces sobre el valor cuantitativo aproximado de esa diferencia (escalas de 5 puntos: ninguna, débil, media, fuerte, muy fuerte). Los ternas estudiadas en cada muestreo fueron: CCO_s; CCO₁; CCO₂; CCO₃; CCB; BO_sO_s; BO₁O₁; BO₂O₂; BO₃O₃; O₁O₁O₂; O₂O₂O₃; O₁O₃O₃; O_sO_sO₁; O_sO₂O₂; O_sO_sO₃, siendo C, el control (sin oxígeno y sin viruta); B, la bota; O₁, O₂, O₃, las muestras microoxigenadas con cantidades crecientes de oxígeno y con viruta; y O_s la muestra sin microoxigenar y con viruta.

b) Descriptiva. Su objetivo fue caracterizar cualitativa y cuantitativamente el aroma (UNE 87017) utilizando para ello escalas de intervalo de 9 puntos (UNE 87020). Los descriptores finalmente seleccionados para el estudio fueron: *intensidad aromática* (magnitud de las sensaciones positivas y negativas percibidas por vía nasal, *punzante* (sensación de irritación en la mucosa nasal), *pegamento* (olor a acetato de etilo), *vinoso* (que recuerda al vino), *afrutado* (olor a frutas blancas - manzana, pera, plátano- maduras o no), *dulce* (recuerda a vainilla), *roble* (olor a madera, a bota), *fermentación/lías* (olor que recuerda a la fermentación de mostos), incluyéndose la valoración *impresión general* (juicio hedónico del olor) (ver anexo XII.2 al final del capítulo).

XII.2.6. Análisis estadístico.

Para estudiar los parámetros analíticos se llevaron a cabo análisis de componentes principales (Principal Component Analysis, PCA) y análisis lineal discriminante (Linear Discriminant Analysis, LDA) empleando el paquete informático StatGraphics Centurion, versión 15.0, (Statpoint Inc., Virginia, EE.UU.). Para el tratamiento de datos derivados del análisis sensorial se realizaron PCA con el paquete informático Statistica, versión 7.0. (Statsoft Inc., Oklahoma, EE.UU.).

XII.3. Resultados y discusión.

XII.3.1. Compuestos volátiles.

Todos los datos obtenidos fueron sometidos, en primer lugar, a un análisis de componentes principales (PCA, principal component analysis). La figura XII.1 muestra los resultados obtenidos para la primera experiencia, donde se extrajeron 8 componentes principales que explicaban el 82.16% de la variabilidad de los datos.

Para la segunda experiencia se obtuvieron resultados similares.

En ninguno de los dos ensayos se obtuvo un claro agrupamiento de las muestras respecto a su perfil volátil. Como se puede observar, las muestras correspondientes al envejecimiento tradicional se sitúan de manera aleatoria entre las correspondientes al envejecimiento acelerado.

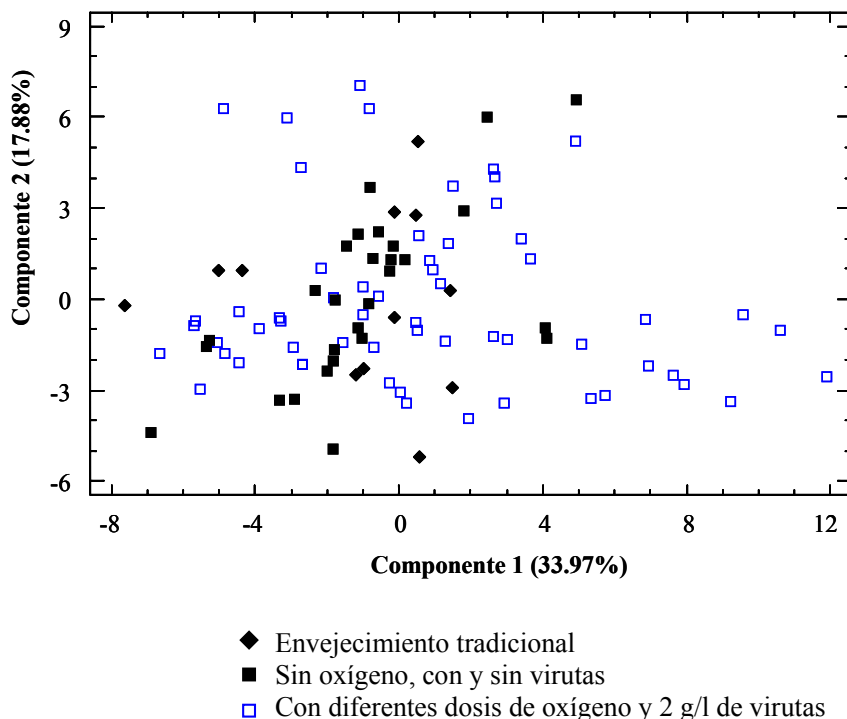


Figura XII.1. Análisis de componentes principales para los compuestos volátiles. Experiencia 1.

Para forzar el agrupamiento de los datos en función de las dosis de oxígeno suministradas, se empleó a continuación una técnica quimiométrica supervisada como el análisis lineal discriminante (LDA, linear discriminant analysis) mostrándose los resultados en la figura XII.2.

Se obtuvieron dos funciones discriminantes ($p < 0.05$). La tabla de clasificación mostró un porcentaje de correcta clasificación del 98.91%. Las variables con mayor peso en estas funciones fueron: benzaldehído, acetato de bencilo, eugenol, terpineol, 3-metilbutanol, ácido octanoico, ácido hexanoico y ácido decanoico.

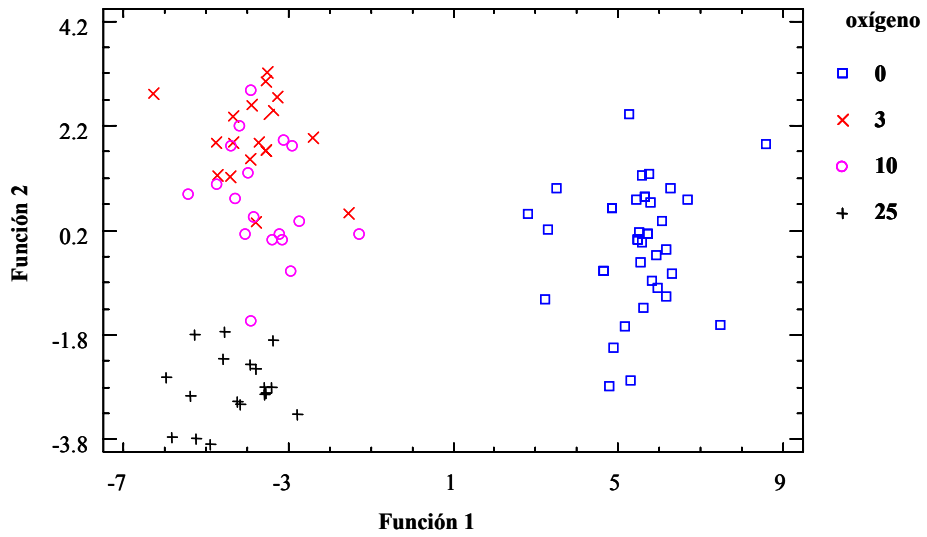


Figura XII.2. Análisis lineal discriminante de la composición volátil. Experiencia 1.

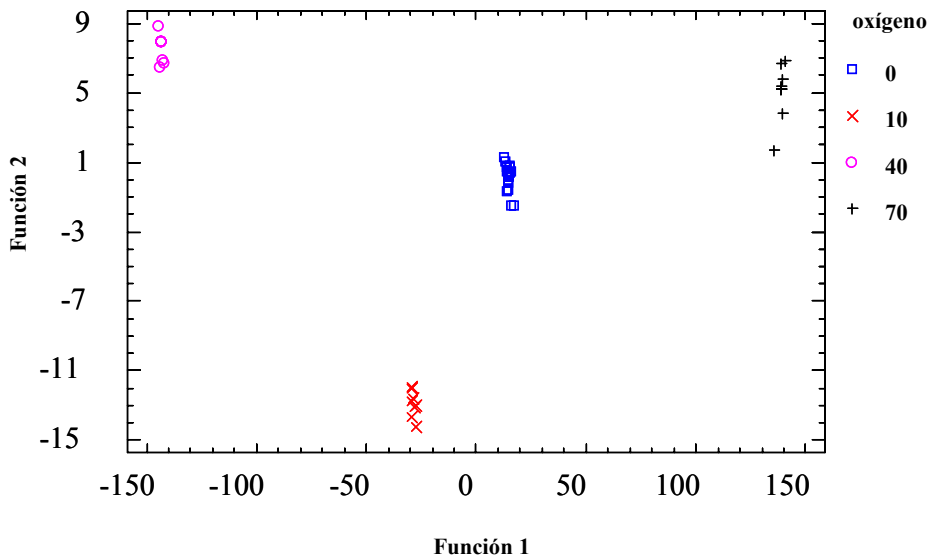


Figura XII.3. Análisis lineal discriminante de la composición volátil. Experiencia 2.

Para el segundo ensayo, el LDA dio lugar a la obtención de 3 funciones discriminantes ($p < 0.05$) alcanzándose así un grado de clasificación

correcta del 100%, tal y como puede verse en la figura XII.3. Los compuestos con mayor peso en las dos primeras funciones discriminantes obtenidas fueron: eugenol, terpineol, feniletanol, 2-metil-1butanol, 3-metil-1-butanol y ácido isobutírico.

XII.3.2. Compuestos polifenólicos.

Para los compuestos polifenólicos, se realizó un PCA de los datos para ambas experiencias.

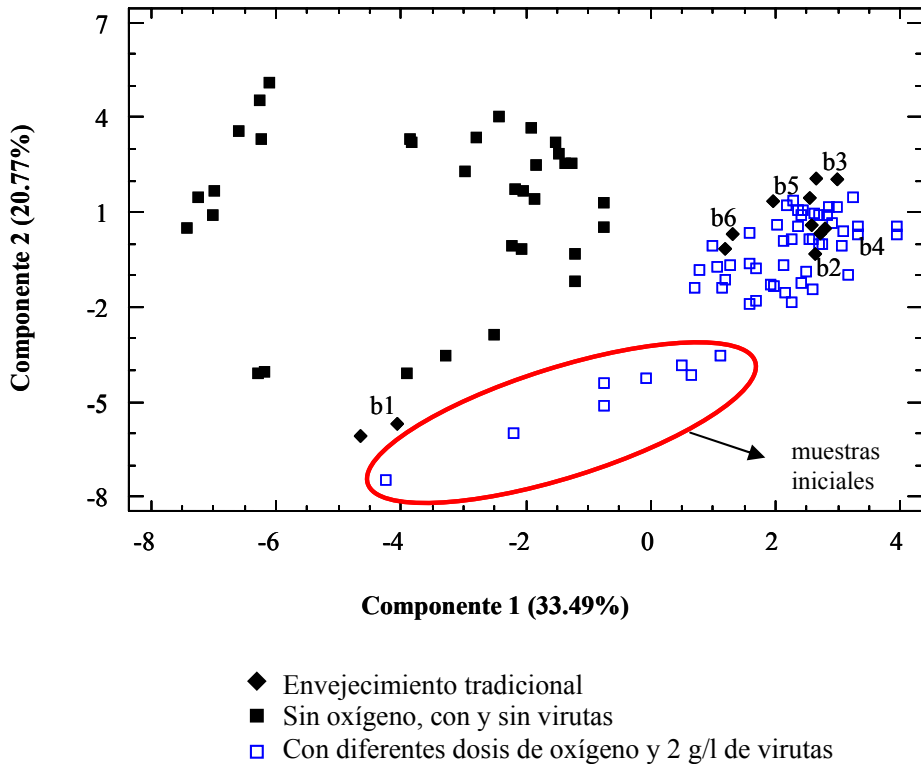


Figura XII.4. Análisis de componentes principales de la composición polifenólica. Experiencia 1.

Para la primera experiencia se obtuvieron 6 componentes principales que explican el 79.88% de la variabilidad entre las muestras. La componente principal 1 diferencia muestras con y sin microoxigenación. Las muestras correspondientes al envejecimiento tradicional se agrupan junto a las microoxigenadas con adición de virutas.

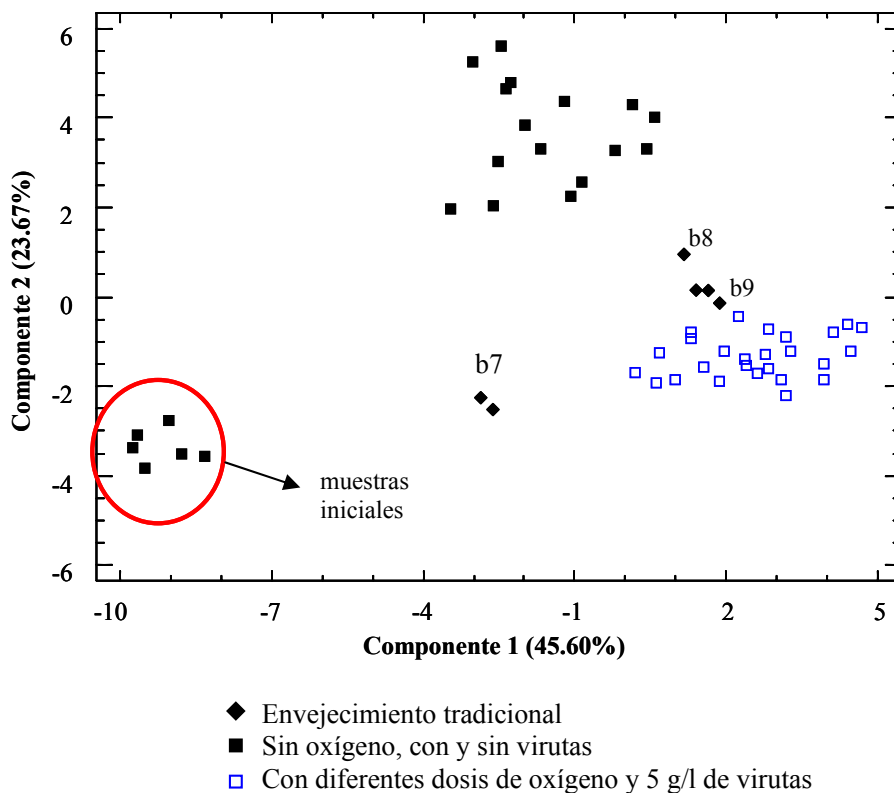


Figura XII.5. Análisis de componentes principales de la composición polifenólica. Experiencia 2.

Para la segunda experiencia se extrajeron 5 componentes principales que explicaban el 84.03% de la variabilidad entre las muestras. De nuevo, la componente principal 1 separa las muestras en dos grupos, con y sin microoxigenación. Las muestras de envejecimiento tradicional de mayor

vejez (3 meses (b8) y 3.5 meses (b9)) se agrupan con las muestras con virutas (5 g/l) y microoxigenación.

De los resultados obtenidos se demuestra que se ha conseguido una aceleración del proceso de envejecimiento, en lo que a composición polifenólica se refiere, no alcanzándose resultados claros y concluyentes en el caso de la fracción volátil. Como se puede observar en las figuras anteriores, las muestras microoxigenadas de la segunda experiencia se asemejan a las muestras de mayor envejecimiento tradicional, las cuales habían estado sometidas al proceso de envejecimiento el doble de tiempo, pues éstas procedían del primer ensayo.

XII.3.3. Análisis del color.

No se observó influencia significativa de ningún factor (virutas, oxígeno y tiempo) sobre las diferentes variables cromáticas estudiadas en el caso del primer ensayo (2 g/l de virutas y dosis de oxígeno de 3-25 ml/l/mes). Sin embargo, en el caso del segundo ensayo (5 g/l de virutas y dosis de oxígeno de 10-70 ml/l/mes), prácticamente todas las variables cromáticas se vieron influenciadas significativamente por los factores oxígeno y tiempo. Conviene recordar aquí que este segundo ensayo se efectuó bajo mayores dosis de oxígeno.

XII.3.4. Análisis sensorial.

XII.3.4.1. Pruebas discriminativas.

En el tratamiento de datos de las pruebas discriminativas (tablas XII.2 y XII.3) se determinó en primer lugar para cada triángulo (con un nivel de certidumbre del 95% y respecto al total de juicios) si el panel detectaba

diferencia entre las muestras, en función del número de juicios que seleccionaron la muestra singular del triángulo. Cuando la diferencia se concluyó significativa, se calculó su valor medio.

Respecto a la evolución temporal de los distintos ensayos, evaluada mediante comparación con el vinagre control, pudo observarse que el depósito sin oxigenación mostró la evolución más lenta, si bien en el ensayo con mayor cantidad de viruta ésta fue algo mayor. Sorprendentemente, las condiciones que mejor permitieron diferenciar los vinagres elaborados respecto del control fueron las extremas de menor y mayor dosis de oxígeno. Las máximas diferencias con el control se alcanzan en distintas semanas para las distintas dosis de oxígeno, lo que apunta a la necesidad de realizar una optimización experimental del tiempo de envejecimiento en función de las condiciones de elaboración.

No se observa diferencia significativa entre los vinagres elaborados con distintas dosis de oxígeno. En algunas semanas del ensayo con 2 g/l de viruta, se detectó cierta diferencia entre los vinagres con menor y mayor oxigenación frente al obtenido sin dosificación de oxígeno, lo que concuerda con la observación anterior sobre sus diferentes evoluciones temporales. En el ensayo con 5 g/l de viruta, la mayor diferencia se detectó entre el vinagre no microoxigenado y el envejecido con una menor dosis de oxígeno.

La comparación con el vinagre envejecido en bota permite concluir que durante el tiempo que transcurrieron los ensayos con 2 g/l de viruta, los productos más similares fueron los obtenidos con una mayor dosis de oxígeno.

Las intensidades de las diferencias son mayores en los ensayos de elaboración realizados con mayor cantidad de virutas de roble.

Tabla XII.2. Resultados pruebas discriminativas triangulares. Ensayo 2 g/l viruta (25, 10, 3, 0 ml O₂/l/mes)

Comparaciones	N° de juicios coincidentes			¿Presentan las muestras diferencia significativa?						Media de la diferencia ¹								
	Semana 1 ²			Semana 2 ³			Semana 3 ⁴			Semana 4 ²			Semana 5 ³			Semana 6 ²		
C-O ₁	1	No		3	No		7	Sí	1,6	1	No		5	Sí	1,2	5	Sí	2,8
C-O ₂	1	No		5	Sí	1,6	7	Sí	1,8	6	Sí	1,3	5	Sí	2,0	5	Sí	2,4
C-O ₃	2	No		5	Sí	2,2	6	No	2,5	3	No		5	Sí	1,8	5	Sí	2,4
C-O ₅	3	No		5	Sí	1,2	6	No	1,4	3	No		3	No		3	No	
C-B	5	Sí	2,2	4	No	1,7	5	No	1,8	2	No		3	No		5	Sí	1,8
B-O ₁	4	No	1,5	1	No		4	No		3	No		1	No		1	No	
B-O ₂	0	No		3	No		5	No	1,2	1	No		4	No	1,2	6	Sí	1,5
B-O ₃	1	No		2	No		7	Sí	2,2	3	No		4	No	1,5	4	No	2,0
B-O ₅	2	No		2	No		5	No	1,6	3	No		3	No		5	Sí	1,8
O ₅ -O ₃	2	No		4	No	1,5	8	Sí	2,1	1	No		2	No		4	No	2,2
O ₅ -O ₂	2	No		2	No		4	No		2	No		2	No		5	Sí	2,4
O ₅ -O ₁	1	No		5	Sí	1,7	3	No		4	No	1,1	5	Sí	1,5	4	No	1,5
O ₃ -O ₂	3	No		3	No		4	No		4	No	1,0	1	No		2	No	
O ₂ -O ₁	2	No		3	No		2	No		2	No		3	No		3	No	
O ₃ -O ₁	3	No		2	No		5	No	2,0	2	No		2	No		3	No	

¹ Escala: 0=Ausencia; 1=Muy débil; 2=Débil; 3=Media; 4=Fuerte; 5=Muy fuerte

² Mínimo n° de juicios coincidentes (N=6; 95% certidumbre): 5

³ Mínimo n° de juicios coincidentes (N=7; 95% certidumbre): 5

⁴ Mínimo n° de juicios coincidentes (N=10; 95% certidumbre): 7

Intensidad de diferencia débil o menor, Intensidad de diferencia entre débil y media, Intensidad de diferencia entre media y fuerte

Tabla XII.3. Resultados pruebas discriminativas triangulares. Ensayo 5 g/l viruta (70, 40, 10, 0 ml O₂/l/mes)

Comparaciones	N° de juicios coincidentes			¿Presentan las muestras diferencia significativa?									Media de la diferencia ¹		
	Semana 1 ²			Semana 2 ³			Semana 3 ⁴			Semana 4 ⁵			Semana 6 ⁴		
C-O ₁	3		2,3	4	No		6	Sí	1,3	6	Sí	1,3	5	Sí	1,6
C-O ₂	3		1,7	2	No		3	No		4	No		4	No	1,5
C-O ₃	4		1,3	6	Sí	1,5	6	Sí	1,3	7	Sí	1,7	6	Sí	1,7
C-O ₅	1			5	No	1,3	5	No	1,2	5	No	1,0	6	Sí	1,7
C-B ⁶							4	No	1,2	6	Sí	1,5	4	No	2,0
O ₅ -O ₃	3		1,0	5	No	1,0	3	No	1,1	4	No		5	Sí	1,5
O ₅ -O ₂	1			4	No		1	No		1	No		1	No	
O ₅ -O ₁	1			4	No		2	No		5	No	1,4	3	No	
O ₃ -O ₂	2			2	No		1	No		2	No		1	No	
O ₂ -O ₁	1			0	No		1	No		2	No		1	No	
O ₃ -O ₁	1			4	No		3	No		2	No		3	No	

¹ Escala **modificada**: 0=Ausencia; 1=Débil; 2=Media; 3=Fuerte; 4=Muy fuerte

² Mínimo n° de juicios coincidentes (N=4; 95% certidumbre):

³ Mínimo n° de juicios coincidentes (N=9; 95% certidumbre): 6

⁴ Mínimo n° de juicios coincidentes (N=6; 95% certidumbre): 5

⁵ Mínimo n° de juicios coincidentes (N=8; 95% certidumbre): 6

Intensidad de diferencia débil o menor

Intensidad de diferencia entre débil y media

Intensidad de diferencia entre media y fuerte

⁶Las semanas 3, 4 y 6 de la Bota corresponden realmente con la 9, 12 y 14, respectivamente.

XII.3.4.2. Pruebas descriptivas.

Respecto a las pruebas descriptivas, en primer lugar se calcularon las medias por atributo, junto con los coeficientes de correlación de cada uno respecto a los demás, con el fin de descartar los de baja intensidad con poca contribución en el olor, y también aquellos otros cuya información fuera redundante. Se seleccionaron finalmente los descriptores: *intensidad aromática*, *punzante*, *pegamento*, *vinoso*, *afrutado*, *dulce*, *roble*, *fermentación/lías*, e *impresión general*, y se descartaron *manzana oxidada*, *vainilla* y *tostado*. Según la matriz de correlaciones, en la *impresión general* influyen de manera significativa la totalidad de los descriptores, todos en sentido positivo salvo el olor a *lías*, presentando la mayor contribución la *intensidad aromática*. El resto de las correlaciones significativas tienen coeficientes no muy elevados, lo que indica que los atributos seleccionados aportan distinta información y por tanto resultan adecuados para la descripción del olor de los vinagres.

Se realizaron análisis de la varianza de dos vías en los que se incluyó el factor juez, para validar de esta forma la homogeneidad del panel. En varios de los análisis no pudo obtenerse modelo válido, bien por un defecto de datos que impidió la evaluación de alguno de los factores en estudio, o bien por un coeficiente de ajuste del modelo (r^2) que no distó significativamente de 0. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos pueden realizarse algunas observaciones.

Se aplicó el análisis de la varianza a cada descriptor en las distintas semanas de los ensayos, con el fin de evaluar la capacidad de cada uno para discriminar entre las muestra (C, B, O₁, O₂, O₃, Os). El más discriminante de los descriptores utilizados es *roble*, relacionándose de manera directa con los

vinagres elaborados a menor dosis de oxígeno, lo que confirma los resultados de las pruebas triangulares. La menor intensidad corresponde, como cabe prever, con el vinagre control, a la que sigue el vinagre procedente del envejecimiento en bota. Otros descriptores que permiten la diferenciación en algún caso son: *pegamento*, *vinoso* y *dulce*.

Para determinar si la evolución temporal en cada depósito se traduce en diferencias de percepción en la intensidad de los distintos descriptores, se llevaron a cabo análisis de la varianza sobre los datos considerando las semanas de muestreo como factor de variación (S1, S2, S3, S4, S5, S6). Principalmente *roble* pero también en algún caso *intensidad aromática*, *afrutado* y *pegamento* permiten un ordenamiento de las muestras con el tiempo de ensayo, y en algún caso diferenciarlas de manera estadísticamente significativa.

En el intento de obtener una mayor información sobre cuáles son los atributos que justifican las diferencias detectadas en las pruebas discriminativas, se realizaron análisis de la varianza de los datos descriptivos de cada par diferenciado, esto es, con dos niveles. Los resultados confirman el protagonismo del olor a *roble* en la diferenciación (con valores superiores en los ensayos con menor dosis de oxígeno), señalando además en algunos casos una diferencia de intensidad en el carácter *vinoso* de las muestras, que se apunta mayor en el vinagre control.

Se presentan, además, los gráficos de araña de los descriptores de mayor capacidad discriminativa, esto es: *intensidad aromática*, *pegamento*, *vinoso*, *afrutado* y *roble*.

La figura XII.6 permite obtener una clara idea de la evolución del vinagre envejecido en bota. Éste se traduce en un aumento continuado de la

intensidad del descriptor *pegamento*, como consecuencia de los procesos de esterificación característicos del envejecimiento, que generan, entre otros, ésteres acetato de etilo. El carácter *afrutado* disminuye al principio (por pérdida de los olores del vinagre que recuerdan aun a la uva de la que procede), y aumenta más tarde, probablemente por la ya comentada formación de ésteres, tales como acetato de isoamilo de marcado olor a frutas. Como cabe esperar, a lo largo del proceso de envejecimiento disminuye el carácter *vinoso*, y aumenta el olor a *roble*, si bien esto último ocurre de manera significativa al principio para luego permanecer más o menos estable. Como consecuencia de los cambios en distinto sentido, se percibe un aumento de la *intensidad aromática* total.

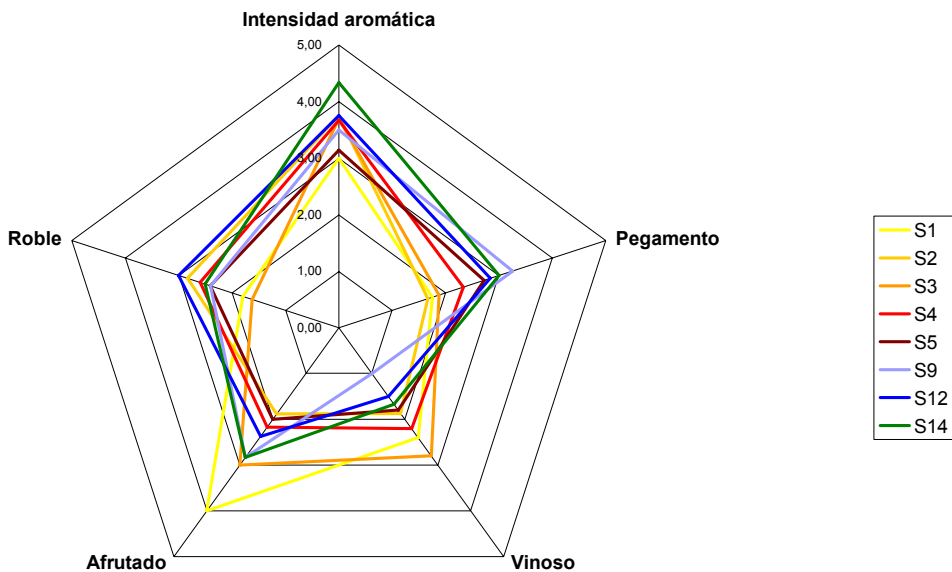


Figura XII.6. Gráfico de araña de la evolución del vinagre envejecido en bota

En la figura XII.7 se muestran los gráficos de araña de los ensayos con adiciones de viruta de 2 y 5 g/l, en las últimas semanas del experimento.

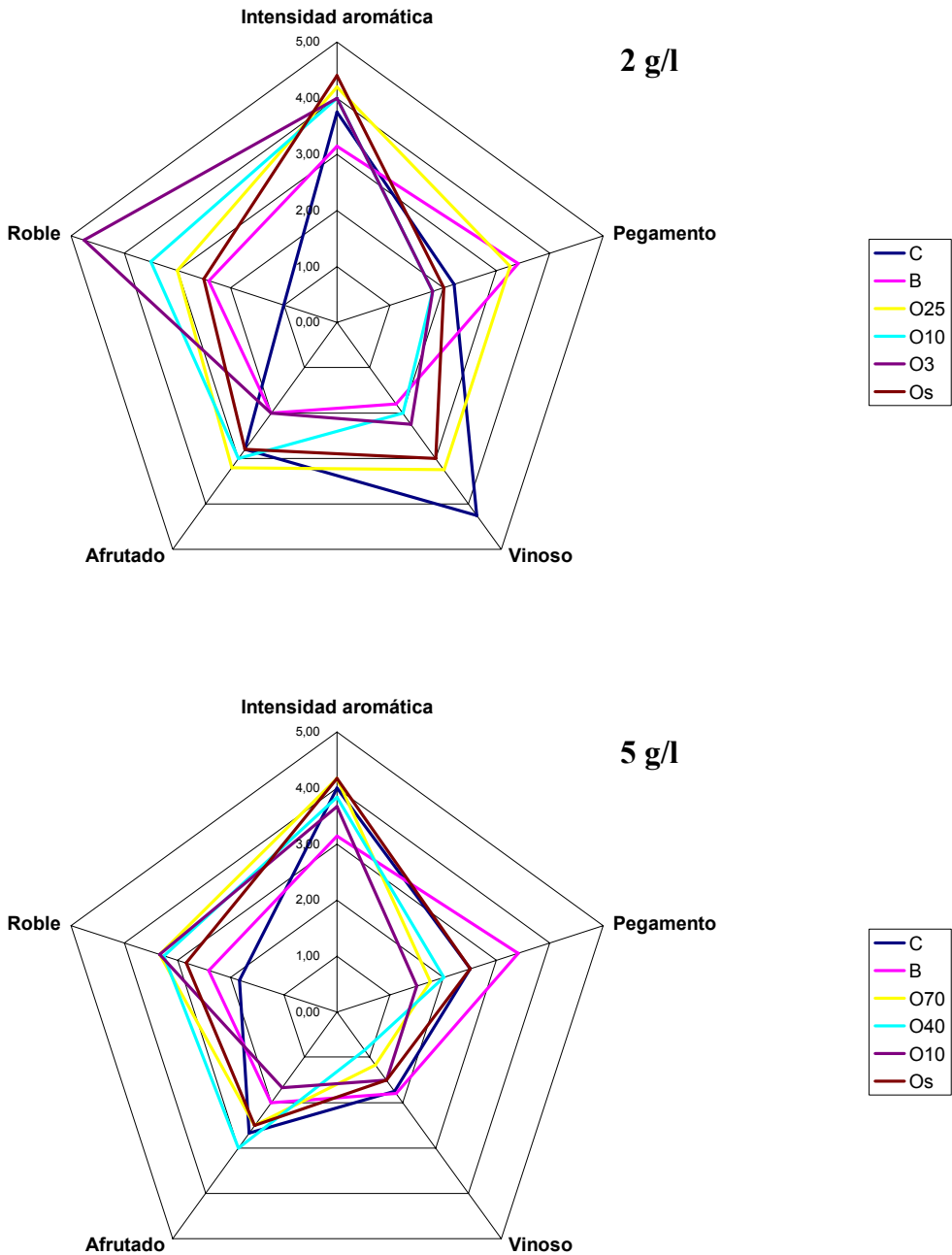


Figura XII.7. Gráficos de araña a 2 y 5 g/l.

En el ensayo con menor adición de viruta, se observa una deformación del pentágono desde la mayor oxigenación (O25), de forma casi regular, hasta el muy alargado en el vértice correspondiente al *roble* del vinagre con menor dosis de oxígeno (O3), pasando por el intermedio O10. Estas muestras presentan una evolución inversa respecto a las intensidades en *pegamento* y *afrutado*, caracteres relacionados de manera directa con el envejecimiento natural, tal como se comentó en el gráfico de araña de B. La interpretación de estas observaciones no es clara. Sin embargo, sí parece claro que en la última semana del ensayo, el perfil del vinagre elaborado con mayor microoxigenación es el más parecido al del envejecimiento natural en bota. En los ensayos con 5 g/l de viruta, el vinagre con mayores diferencias respecto al obtenido por envejeciendo natural en bota es el elaborado con una menor dosis de oxígeno (O10), que presentan las menores intensidades de *pegamento* y *afrutado*, y las mayores de *roble*, aunque las diferencias respecto a las oxigenaciones O70 y O40 no parecen en este caso importantes.

XII.3.4.3. Análisis de componentes principales.

Por último, se realizó un análisis de componentes principales con el conjunto de los datos, extrayéndose 2 primeros factores que explican el 70% de la variabilidad de éstos (figura XII.8). La CP1 se relaciona principalmente con la *intensidad aromática* y la *impresión general*, lo que confirma la preferencia de los jueces por aromas intensos. Adicionalmente, los pesos medios de los atributos *pegamento* y *dulce* apuntan a que estas notas contribuyen en alguna medida al aroma principal de los vinagres, y también a su aceptabilidad. Por otro lado, la CP2 presenta cargas elevadas para *vinoso* (y *afrutado* en menor grado) en un sentido, y *roble* en el contrario. Según esto, esta segunda componente se relaciona con el grado de envejecimiento.

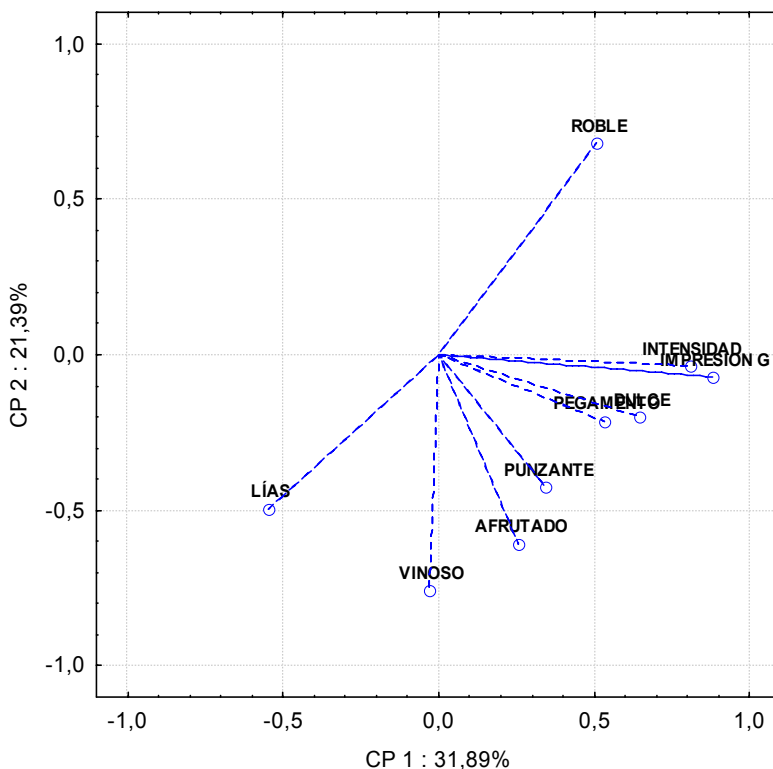


Figura XII.8. Proyección de los descriptores sensoriales sobre el plano de las 2 primeras componentes principales

Al proyectar las muestras sobre el plano de las componentes 1 y 2, pueden realizarse algunas observaciones (figura XII.9). Como cabía prever, las muestras de vinagre testigo, no sometidas a contacto alguno con roble, se distribuyen en la zona inferior respecto al CP2. Los vinagres elaborados con mayor cantidad de viruta junto con algunas de las finales (S6) del ensayo con 2 g/l de se sitúan en la mitad derecha del plano, lo que indica una mayor intensidad aromática y mejor impresión general.

A partir de la segunda semana (S3-S6), las muestras de los vinagres del ensayo con 5 g/l de viruta y microoxigenación (O10, O40 y O70), se

hallan muy agrupadas en el primer cuadrante, correspondiente a mayores *intensidades aromáticas y roble*, lo que parece indicar que evolucionan muy rápidamente al principio hasta un perfil que se ve poco afectado por el paso del tiempo de ensayo. No obstante, las máximas intensidades corresponden a la última semana.

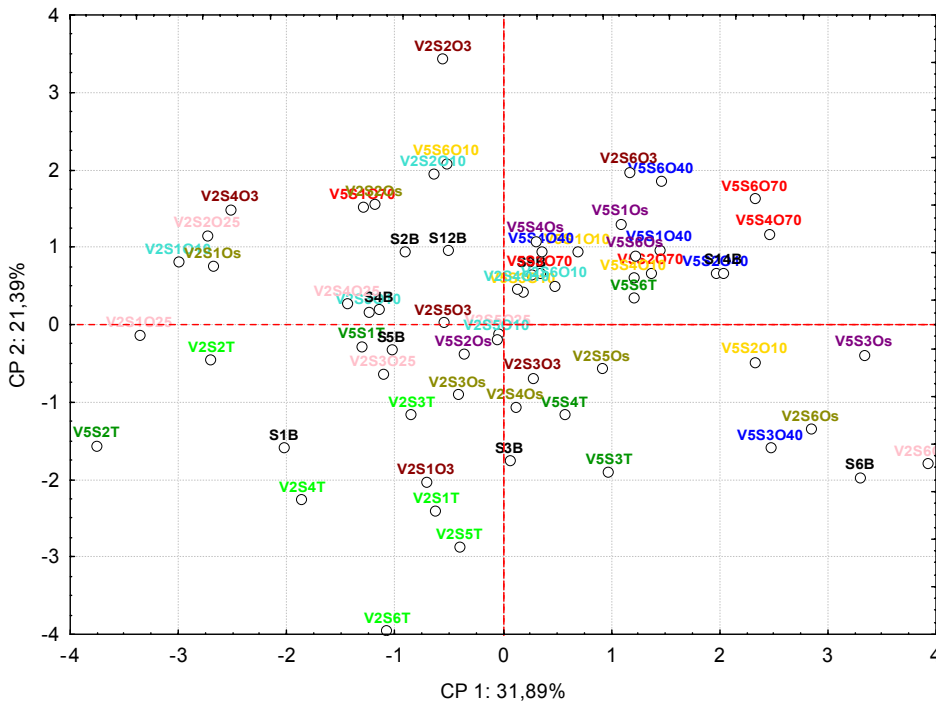


Figura XII.11. Proyección de las muestras de vinagre sobre el plano de las 2 primeras componentes principales.

Codificación:

V2/V5 indica la cantidad de viruta (2 y 5 g/l, respectivamente). En las muestras testigo se usan para indicar el ensayo al que pertenecen, aunque no se adicionara viruta.

S1-S6: Semana de muestreo. Las muestras de bota presentan además S9, S12 y S14.

T: Vinagre testigo, sin adición de viruta

Os, O3, O10, O25, O40, O70: Dosis de oxígeno (en ml/l/mes)

B: Bota

El comportamiento de los vinagres elaborados con 2 g/l de viruta presentan una evolución más paulatina, si bien a la fecha de finalización del

ensayo (S6) las muestras con menor microoxigenación (O3 y O10) se sitúan sobre los elaborados con mayor cantidad de viruta, lo que parece atribuirles semejantes características aromáticas.

Respecto al vinagre envejecido en bota, solo las muestras tomadas a partir de la 9ª semana desde la introducción del vinagre en la bota, se sitúan en el primer cuadrante, el correspondiente a mayores *intensidad aromática*, percepción del aroma a *roble*, y mejor *impresión general*.

XII.5. Conclusiones.

En función de los resultados obtenidos, se puede proponer el método alternativo de envejecimiento acelerado, empleando la microoxigenación y adición de virutas, como herramienta válida para obtener vinagres de características analíticas y organolépticas similares a los vinagres producidos empleando el método de envejecimiento tradicional en botas, pero con un importante ahorro de tiempo.

XII.6. Bibliografía.

- [1] Orden de 5 de Septiembre de 2008. BOJA nº. 184 de 16 de Septiembre de 2008, pág. 29.
- [2] M. Del Álamo, I. Nevares, Anal. Chim. Acta. 563 (2006) 255.
- [3] M. Del Álamo, J.A. Fernández, R. De Castro, Food Sci. Tech. Int. 10 (2004) 233.
- [4] M. Del Álamo, I. Nevares, L.M. Cárcel, L. Navas, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 229.
- [5] L. Monedero, M. Olalla, J.J. Quesada, H. López-García, M.C. López, J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 1754.

- [6] L. Monedero, M. Olalla, M. Villalón, H. López-García, M.C. López, *Food Chem.* 69 (2000) 47.
- [7] V.L. Gutierrez, *J. Food Sci.* 67 (2002) 2415.
- [8] M.L. Morales, W. Tesfaye, M.C. García-Parrilla, J.A. Casas, A.M. Troncoso, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3173.
- [9] M.L. Morales, B. Benítez, A.M. Troncoso, *Food Chem.* 88 (2004) 305.
- [10] M.L. Morales, B. Benítez, W. Tesfaye, R.M. Callejón, D. Villano, M.S. Fernández-Pachón, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, *J. Food Sci.* 71 (2006) 238.
- [11] W. Tesfaye, M.L. Morales, B. Benítez, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 239.
- [12] W. Tesfaye, M.L. Morales, M.C. García-Parrilla, A.M. Troncoso, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 7053.
- [13] J. Boulet, M. Moutounet, “Microoxigenación de los vinos”, en: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, C. Flanzly Ed., MundiPrensa Ediciones, Madrid, 2000, pág 638.
- [14] P. Ducournau, J. Laplace, Patente 93.11073, República Francesa, 1993.
- [15] M. Cano-López, F. Pardo-Mínguez, G. Schmauch, C. Saucier, P.L. Teissedre, J.M. López-Roca, E. Gómez-Plaza, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 5932.
- [16] S. Heux, J.M. Sablayrolles, R. Cachon, S. Dequin, *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (2006) 5822.
- [17] M.C. Llaudy, R. Canals, S. González-Manzano, J.M. Canals, C. Santos.Buelga, F. Zamora, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4246.
- [18] A. Morata, F. Calderón, M.C. González, B. Colomo, J.A. Suárez, *Enólogos* 34 (2005) Marzo-Abril.

- [19] M. Ortega-Heras, M.D. Rivero-Pérez, S. Pérez-Magariño, C. González-Huerta, M.L. González-Sanjosé, *Eur. Food Res. Technol.* 226 (2008) 1485.
- [20] S. Pérez-Magariño, M. Sánchez-Iglesias, M. Ortega-Heras, C. González-Huerta, M.L. González-Sanjosé, *Food Chem.* 101 (2007) 881.
- [21] M.D. Rivero-Pérez, M.L. González-Sanjosé, M. Ortega-Heras, P. Muñiz, *Food Chem.* 111 (2008) 957.
- [22] M.D. Rivero-Pérez, M.L. González-Sanjosé, P. Muñiz, S. Pérez-Magariño, *Food Chem.* 111 (2008) 1004.
- [23] J.J. Rodríguez-Bencomo, M. Ortega-Heras, S. Pérez-Magariño, C. González-Huerta, M.L. González-Sanjosé, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 5102.
- [24] J. Tao, S.I. Dykes, P.A. Kilmartin, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 6104.
- [25] M. Cano-López, F. Pardo-Mínguez, J.M. López-Roca, E. Gómez-Plaza, *Am. J. Enol. Vitic.* 57 (2006) 325.
- [26] C. Castell, A. Morand, G. Pujol, D. Peyron, R. Naudin, *Ind. Bevande* 30 (2001) 271.
- [27] R. Ferrarini, F. Girardi, D. De Conti, M. Castellari, *Ind. Bevande* 30 (2001) 116.
- [28] V. Gerbi, A. Caudana, G. Zeppa, E. Cagnasso, *Ind. Bevande* 30 (2001) 496.
- [29] B. Leoci, M. Ruberti, *Ind. Bevande* 34 (2005) 513.
- [30] P. Cabanillas, J.M. Canals, N. Rozes, L. Arola, F. Zamora, *Tecnología del Vino*, Septiembre/Octubre (1998) 51.
- [31] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 47.
- [32] E. Durán, R. Castro, R. Natera, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 144.

XII.7. Anexos.

ANEXO XII.1. Cuestionario para la discriminación de diferencias entre vinagre mediante pruebas triangulares

NOMBRE:	FECHA:
----------------	---------------

Tendrá disponibles **una serie de triángulos** de muestras. **Para cada uno**, proceda de la siguiente forma:

1. Huela las 3 muestras que se le presentan.
2. Indique, rodeando el código con un círculo, cuál de ellas es diferente.
3. Especifique el grado de diferencia que encuentra, marcando con una X en la casilla correspondiente.
4. Si lo desea, describa en qué consiste la diferencia detectada.

Triángulo	Grado de diferencia				
	Ausencia	Débil	Media	Fuerte	Muy fuerte
255 354 263	Descripción de la diferencia				
874 863 722	Descripción de la diferencia				
408 922 493	Descripción de la diferencia				
430 300 183	Descripción de la diferencia				
535 293 254	Descripción de la diferencia				
453 583 873	Descripción de la diferencia				
800 773 728	Descripción de la diferencia				
229 982 683	Descripción de la diferencia				

ANEXO XII.2. Cuestionario de evaluación de vinagres mediante prueba descriptiva

NOMBRE:	FECHA:
CÓDIGO DE MUESTRA:	

Tendrá disponibles **una serie de muestras. Para cada una**, proceda de la siguiente forma:

1. Mueva ligeramente la copa con la tapa puesta.
2. Destápela y huela en su interior.
3. Para cada atributo, marque con una cruz en la marca vertical de la escala que a su juicio corresponde con la intensidad del estímulo, considerando como referencia la de la muestra que se le proporciona.

EVALUACIÓN OLFATIVA						
Intensidad aromática	Ausente	Débil	Media	Pronunciada	Muy pronunciada	
Atributos	Ausente	Débil	Medio	Pronunciado	Muy pronunciado	
Punzante						
Pegamento						
Vinoso						
Afrutado						
Dulce						
Roble						
Fermentación, lías						
Otros (especificar):						
Impresión general	Malo	Mediocre	Aceptable	Bueno	Muy Bueno	Excelente
OBSERVACIONES (Opcional)						

CONCLUSIONES



Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

- 1) La técnica de SBSE ha sido evaluada para el análisis de compuestos volátiles en vinagre. Se han optimizado las condiciones analíticas de extracción y desorción empleando un diseño factorial de dos niveles, expandido posteriormente a un diseño central compuesto. Para la etapa de extracción, las condiciones analíticas óptimas fueron: volumen de muestra 25 ml sin dilución, tiempo de extracción de 120 minutos, contenido de cloruro sódico de 5.85 gramos y una velocidad de agitación de 1250 rpm. Para la etapa de desorción, las condiciones analíticas optimizadas fueron: temperatura de desorción de 300°C, temperatura de crioconcentración de -140°C, flujo de helio de 75 ml/min y tiempo de desorción de 10 minutos.
- 2) El método de SBSE para el análisis de compuestos volátiles en vinagre, previamente optimizado, fue validado analíticamente. El procedimiento mostraba límites de detección y cuantificación y rangos lineales adecuados para el análisis de este tipo de compuestos. La precisión obtenida se aproximó al 100%, con valores de repetibilidad menores del 13%. El ácido acético compite en la extracción, pero para el análisis cuantitativo, se puede emplear áreas relativas al patrón interno. Esta es una técnica muy simple y que no utiliza disolventes, y está en concordancia con la técnica SPME y, en general, muestra mejores valores de sensibilidad y reproducibilidad.
- 3) Se optimizaron, mediante aproximaciones estadísticas, las condiciones para el análisis de residuos de pesticidas en vinagres

empleando la técnica de SBSE-TD-GC-MS. Después de la optimización, las condiciones analíticas propuestas fueron: volumen de muestra 40 ml, un tiempo de muestreo de 150 minutos y una velocidad de agitación de 1000 rpm. Bajo las condiciones optimizadas empleadas en el estudio, se puede considerar la SBSE como una técnica apropiada para el análisis de este tipo de compuestos en vinagres. Los límites de detección y cuantificación, y los valores de recuperación obtenidos son adecuados para la cuantificación de estos compuestos en vinagres, y, especialmente, para el seguimiento de los productos ecológicos en donde el uso de pesticidas no está permitido.

- 4) Se optimizaron mediante aproximaciones estadísticas, las condiciones para el análisis de compuestos volátiles en vinagres balsámicos tradicionales empleando la técnica de SPE-GC-MS. Se emplearon cartuchos de SPE LiChrolut-EN y las condiciones analíticas finales fueron: 7 gramos de vinagre balsámico tradicional diluido 1:4, 5 ml de agua de lavado y elución con 10 ml de diclorometano. Bajo las condiciones optimizadas empleadas en este estudio, se puede considerar la SPE como una técnica adecuada para la extracción de este tipo de compuestos de matrices con el nivel de complejidad de los vinagres balsámicos tradicionales. Los límites de detección y cuantificación, y la precisión obtenida fueron adecuadas para la cuantificación de los compuestos estudiados. En vista de los resultados obtenidos, el método desarrollado puede ser usado para investigaciones posteriores relacionadas con la composición volátil de los vinagres balsámicos tradicionales, aumentando el número de compuestos estudiados.

- 5) Se realizaron calibraciones de FT-IR para determinar los compuestos aromáticos presentes en los vinagres durante el proceso de acetificación. Durante este proceso, se lleva a cabo un cambio en la concentración de las especies mayoritarias. Para realizar estas calibraciones FT-IR, se emplearon zonas específicas del espectro infrarrojo, lo que permitía validar estas calibraciones con valores de errores de predicción por debajo del 10% para los ésteres etílicos y alcoholes superiores, y con errores por debajo del 20% para los ácidos grasos. Para el caso de los derivados del ácido acético y los furfurales, los errores de predicción en la validación del método estaban entre el 20 y el 30%. Con estos resultados, la FT-IR se presenta como una técnica válida para el seguimiento del proceso de fermentación acética y para controlarlo on-line, basándose en la producción y la variación de los componentes relacionados con la calidad del vinagre.
- 6) La espectroscopía infrarroja ha sido capaz de clasificar muestras de vinagres de diferentes materias primas y procesos de producción (con y sin envejecimiento en madera). Los porcentajes de clasificación correcta obtenidos fueron similares a los obtenidos empleando diversos parámetros analíticos. Este hecho, sumado a las diferentes ventajas de la técnica (rapidez, es no destructiva, bajo coste, sin preparación de muestra, sin personal de laboratorio cualificado, etc.), la transforma en una herramienta prometedora para la clasificación de vinagres de diferentes materias primas y procesos de producción, con un grado similar de fiabilidad a los obtenidos empleando diferentes parámetros analíticos que se caracterizan por tener un elevado coste y mayor tiempo de realización. Sin embargo, se debe ser prudente y tener en cuenta que las conclusiones del estudio son limitadas por el número de


muestras, relativamente pequeño. Para validar totalmente la capacidad del infrarrojo medio para la clasificación de muestras de vinagre será necesario el empleo de una mayor cantidad de muestras.

- 7) Se ha desarrollado un método de extracción asistida por ultrasonidos aplicado a los pesticidas en las uvas y previo al análisis por SBSE-GC-MS. Ha sido aplicado al estudio de la trazabilidad de los productos fitosanitarios empleados durante la producción de un vinagre de Jerez. Clorpirifos, triadimenol y folpet se eliminan completamente durante el proceso de producción de vinagre, mientras que el metalaxil permanece en el producto final, pero en una concentración muy baja, segura para el consumo humano.

- 8) Se ha llevado a cabo la caracterización de la composición volátil de vinagres balsámicos tradicionales de Módena, vinagres balsámicos de Módena y vinagres de Jerez, mediante un método de extracción en fase sólida aplicado a GC-MS. Se han identificado y cuantificado en las muestras de vinagre un total de 93 compuestos. Empleando este exhaustivo estudio del perfil aromático, se ha llevado a cabo de manera satisfactoria la diferenciación de los diferentes tipos de vinagre. En general, los datos obtenidos demuestran que los factores que podrían influenciar al impacto aromático de los vinagres analizados son el material de partida (vino o mosto); la duración de la acetificación o envejecimiento en madera; y el procedimiento tecnológico que pudiera producir una degradación importante de los azúcares. Los ácidos carboxílicos de cadena corta, los compuestos furánicos y los acetatos fueron capaces de discriminar los tres vinagres de alta calidad estudiados.

- 9) Se ha llevado a cabo la formación, entrenamiento y validación del panel de cata para la evaluación sensorial de vinagres. En el estudio realizado se ha trabajado con un panel de 6-10 jueces pertenecientes al personal del departamento de Química Analítica, que se reunieron semanalmente en sesiones de 2-3 horas hasta conseguir el dominio necesario para llevar a cabo pruebas discriminativas y descriptivas sencillas. Para su selección y entrenamiento se siguieron los criterios contemplados en la norma UNE 87024-1 para jueces de laboratorio y entrenados.
- 10) Se ha desarrollado un método de envejecimiento basado en la adición de virutas junto con el uso de microoxigenación, que pretende acelerar el proceso, así como conseguir un vinagre con características analíticas y organolépticas similares al obtenido mediante envejecimiento tradicional. Se ha determinado la composición polifenólica, la composición volátil y el análisis del color. Además, se han llevado a cabo análisis sensoriales de todas las muestras por medio de un panel de catadores expertos. En función de los resultados obtenidos, se puede proponer el método alternativo de envejecimiento acelerado, empleando la microoxigenación y adición de virutas, como herramienta válida para obtener vinagres de características analíticas y organolépticas similares a los vinagres producidos empleando el método de envejecimiento tradicional en botas, pero con un importante ahorro de tiempo.

ENGLISH SUMMARY



INDEX

<i>JUSTIFICATION AND OBJECTIVES</i>	344
<i>THEORETICAL FUNDAMENTS AND BACKGROUND</i>	346
<i>DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODOLOGY</i>	348
I. Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars.	348
II. Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: validation study and comparison with solid phase microextraction.....	351
III. Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of pesticides in vinegars.	356
IV. Solid-phase extraction method for determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar.	360
<i>APPLICATIONS TO PRODUCTION PROCESSES</i>	363
I. Control of Sherry wine vinegar’s acetic fermentation process by means of SBSE-GC-MS and FT-IR.....	363
II. Differentiation and classification of vinegars from different raw materials.	366
III. Traceability of phytosanitary product in the production of a Sherry wine vinegar.	370
IV. GC-MS characterization of volatile compounds in quality vinegars with protected European geographical indication.....	373
V. Accelerated aging studies with microoxygenation and chips in the production of a Sherry wine vinegar.....	376
<i>CONCLUSIONS</i>	378

JUSTIFICATION AND OBJECTIVES

Vinegar has been part of human nutrition from far-off times, being used as condiment and food preservative as well as simple remedies staple for men and animals. Vinegar is a product whose value and appreciation from the consumers is increasing in the last years. Vinegar-producing companies' objective is to obtain high quality vinegars and all the possible technology is applied to achieve this objective. The importance of vinegars production is such that responsible organisms of these products are becoming needed. An example of that is the appearance of the Sherry wine vinegar Denomination of Origin. This denomination is referred to vinegars exclusively obtained from wines made with grapes cultivated in the production zone of "Jerez-Xérès-Sherry" and "Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda" Denominations of Origin, with a minimum alcoholic graduation of 9.5° and a total minimum acidity of 2.5 g/L expressed as tartaric.

Nowadays, two different methods of acetification are employed. These methods produce very different vinegars from a chemical and organoleptic point of view: vinegars produced using a slow traditional method of acetification with superficial culture; and vinegars obtained by means of a rapid acetification in specific bioreactors with submerged culture.

Sherry wine vinegar is aging using either a static system called "añadas", or a characteristic dynamic system called "criaderas y solera", being this last one, the most widespread and generalized.

Up to a few years ago, Sherry wine vinegar had been considered just a secondary foodstuff. However, it is now highly appreciated as a product with a great quality, at the same level of typical wines and brandies of this area. Therefore, producers demand new techniques in order to determine the suitable parameters which control the elaboration processes, improve the quality of the final product, and, moreover, describe and differentiate this special vinegar.

Due to the diversity of vinegars on the market and the increase in demand, it has been considered necessary to investigate reliable analytical methods to establish criteria for determining quality and origin, since objective authentication remains an unresolved issue. Vinegar quality is heavily influenced by flavour compounds, as well as by other components such as polyphenols or organic acids. Its chemical and organoleptic properties are determined by the acetification system, the raw material used as substrate and, in some cases, by the wood aging. The different raw materials and technological procedures that can be used result in a great variety of products of diverse quality and organoleptic properties. Besides, new spectroscopic techniques such as FT-IR are capable of providing information in relation of all these mentioned characteristics.

On the other hand, since 2005 it is compulsory to have a traceability system in foods production, which is able for his part, besides guaranteeing the food safety, guaranteeing the distinguishing characteristics of high quality Sherry wine vinegar.

In spite of the trends towards the use of an ecologic agriculture, nowadays it is necessary to employ phytosanitary products, with the aim of guaranteeing too many

cultures, both in quantity and in quality. This quality obviously forces to assure the no-presence of chemical residues in the manufactured product. This trend has also been observed in vinegar and an increasing amount of products with the “ecologic etiquette” is appearing in the market.

Nowadays there are too many recommended products for the control of the plagues and diseases of the grapevine which in one or other way may persist, during the different production steps, to the final vinegar. When a phytosanitary treatment is realized, a certain amount of substance remains in the plant, and it is called pesticide deposit. This quantity of pesticide is diminishing progressively in the time until the moment of the vintage, when only the residue appears.

So not only for the influence that could have in the organoleptic characteristics of the vinegar, or for the risk in the public health that could suppose a high quantity of these residues, but also for its implication in the obtaining of the denomination of "ecological vinegar", more appreciated and demanded by the consumer each time, it is interesting to possess sensitive methods to be able to determine the levels of phytosanitary products in vinegars, which allow the control of the product traceability.

Therefore, the thesis objectives are the following:

- 1) Development of analytical methods to control the parameters related to the production of Sherry wine vinegar, the quality warnings and those involved in the traceability of this product as well.
- 2) Study of the behaviour of the parameters related to the vinegar production (acetification) and monitoring of the process, as well as improvements of it.
- 3) Study of both the traditional Sherry wine vinegar aging system, and alternative assays in order to accelerate the processes keeping the quality (use of chips, microoxygenation, etc.)
- 4) Control of the traceability in the Sherry wine vinegar production, controlling the raw material, the production processes and the aging, in view of guaranteeing the origin, the differentiation and the quality, and the particular case of ecologic vinegars as well.
- 5) Comparison of Sherry wine vinegar with other high quality vinegars such as Traditional Balsamic Vinegar from Modena, in terms of the aromatic profile, taking into account their similar aging processes.

THEORETICAL FUNDAMENTS AND BACKGROUND

1. Bibliographic revision of applications of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in enological products.

The study of the volatile fraction in enological products has become necessary and is more than sufficiently justified, considering these compounds make a major contribution to the consumer's overall perception of the quality of these particular food and drink products. In fact these complex volatile compounds largely determine the acceptance or rejection of many products by the consumer. In addition, product characteristics known as "off-flavours", caused by the presence of volatiles that give rise to disagreeable odours and flavours, often imply microbial contamination; therefore the study of volatiles becomes part of the larger subject of food safety.

It must also be borne in mind that the volatile fraction of these food and drink products tends to be conditioned by all the different circumstances of their production, and as a result the characterisation and differentiation of these products may be possible on the basis of the volatile fraction. There is ample evidence in numerous studies that it is possible to establish clear relationships between aspects such as: the raw material employed, the place where that material originated, the process of production followed, etc., and the volatile fraction of the product [1-6].

The determination of the volatile fraction is normally performed by gas chromatography (GC), a technique which in recent years has made great advances. Nevertheless, it should be recognised that, despite this, in the majority of the cases, determination by GC needs to be preceded by a prior stage of sample preparation. The need for sample preparation is imposed by various factors, most notably:

- The low concentrations in which the analytes of interest are present.
- The great chemical variety that these present: acids, alcohols, esters, ketones and many other types of compound can be found.
- The fact that in the majority of cases these compounds are found in matrices of great complexity, as is the case of enological products.
- And lastly, the low chemical stability of the compounds, together with the limited specificity of the systems of detection.

All of these considerations lead us to seek techniques that allow their fractionation and concentration prior to the analysis by GC, making sample preparation a critical step when characterising the volatile fraction of these products.

If it is first considered how to classify the various different techniques used for sample preparation prior to GC analysis, a number of different classifications in use is found. One of the criteria adopted when dealing with this classification is the physico-chemical property on which the isolation of these analytes is based [7]. Thus we find there are techniques based on:

- The volatility of the analytes: distillation processes and head space techniques.

- The analyte's solubility in certain organic solvents: soxhlet extraction, liquid-liquid extraction (LLE), supercritical fluid extraction (SFE), solid phase extraction (SPE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and microwave-assisted extraction (MAE).
- The adsorption and absorption of the analyte on a particular material: solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME), stir-bar sorptive extraction (SBSE) and solid phase dynamic extraction (SPDE).
- And a last group where we find those techniques that make use of both properties: the most notable of these is simultaneous extraction-distillation, together with other instrumental configurations where several of the previously mentioned techniques are combined.

Due to the importance of the sample preparation phase in the GC analysis, as a previous step in the development of analytical methods applied to the study of volatile compounds in vinegar, a bibliographic review of the different solid-phase extraction techniques applied to enological products was carried out. It is divided into four different chapters: SPE, SPME, SBSE and SPDE. The complete bibliographic review is attached in the appendix at the end of this summary.

REFERENCES:

- [1] R. Natera, R. Castro, M. V. G. Moreno, M. J. Hernández, C. G. Barroso, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 3345.
- [2] M. L. Morales, G. A. González, J. A. Casas, A. M. Troncoso, Eur. Food Res. Technol. 212 (2001) 676.
- [3] S. J. Lee, D. Rathbone, S. Asimont, R. Adden, S. E. Ebeler, Am. J. Enol. Vitic. 55 (2004) 346.
- [4] P. Hernández-Orte, M. J. Ibarz, J. Cacho, V. Ferreira, Food Chem. 89 (2005) 163.
- [5] C. Plata, J. C. Mauricio, C. Millan, J. M. Ortega, World J. Microb. Biot. 21 (2005) 115.
- [6] Z. Piñeiro, R. Natera, R. Castro, M. Palma, B. Puertas, C. G. Barroso, Anal. Chim. Acta 563 (2006) 165.
- [7] R. Cela, R. A. Loreno, M. C. Casais, Técnicas de separación en Química Analítica. Síntesis, Madrid, 2002.

DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHODOLOGY

I. Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars.

Vinegar is now a product of high reputation, much appreciated in gastronomy. Due to the diversity of vinegars on the market and the increase in demand, it has been considered necessary to investigate reliable analytical methods to establish criteria for determining quality and origin, since objective authentication remains an unresolved issue. The market value of this type of product can only be sustained if chemical-physical and/or sensorial parameters are found to express differences in composition on the basis of the origin of the vinegar, manufacturing techniques and commercial type.

The flavour of vinegar depends on the raw materials (white and red wines, cider, malted barley, honey, etc.), the constituents formed during the fermentation and, in some cases, the substances formed during the ageing, so it is logical to suppose that vinegars may be characterised and differentiated by the quantitative and qualitative analysis of their volatile components.

Even today, the extraction and concentration of flavour components, prior to their GC analysis, constitute a problem that has still not been satisfactorily resolved. In recent years there has been an increasing interest in developing new analytical techniques for the monitoring of volatile compounds in a wide variety of matrices. In the bibliography, various methods can be found for the capillary GC analysis of volatile components [1-5]. The tendency is to develop accurate, easy-to-automate and sensitive methodologies which reduce sample handling. Sample preparation for GC analysis of less volatile compounds has been carried out mainly by liquid/liquid [1] or solid phase [2] extraction. The more volatile compounds are normally analysed by head space or by purge and trap methods [3, 6]. Other preparation techniques employed include supercritical fluid extraction [7], and simultaneous distillation-solvent extraction [8], among others. All these sample preparation methods present several disadvantages, such as excessive cost and time, the possible generation of artefacts, etc.

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a recently-developed technique [9-12] in which a stir bar coated with 50-300 μL of polydimethylsiloxane (PDMS) is employed to extract analytes from a variety of matrices. The extraction mechanism is similar to that of solid phase microextraction (SPME) based on PDMS sorption [13]. A magnetic stirring bar is added to the sample to promote the transfer of analytes to the polymer coating and, after a predetermined extraction period, the analytes are thermally desorbed in the GC injector. The advantage of SBSE is the much higher mass of PDMS available, which results in high recoveries and higher sample capacity. The applications developed with SBSE have shown low detection limits and good repeatability [12, 14, 15], which confirm the great potential of this technique.

In this chapter, the optimisation of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption procedure coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for the determination of volatile compounds in vinegar is described.

The parameters that affect the extraction of the analytes from vinegar into the PDMS coated stir bars and the conditions affecting thermal desorption are investigated

using a chemometric approach based on the use of an optimum set of experiments (experimental design) which allows the simultaneous variation of all experimental factors studied, and the distinguishing of interactions among them that are not detectable with the classical experimental methods [16-17]. For the extraction step, we evaluated the effects of experimental parameters such as sample volume, salting out effect, stirring speed, sampling time and dilution of the sample on the SBSE. For the desorption into the GC, the factors evaluated were desorption temperature, desorption time, helium flow and cryofocusing temperature in the PTV injector. In both cases, the effects of these parameters were evaluated using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. This chemometric tool is very appropriate in screening experiments where the aim is to investigate possibly influential and/or interacting factors. The juxtaposition of a two-level design with a star design (the centres of the two designs coincide) gives a composite design. It is one of the most useful designs for estimating a multifactor response surface [16-17], which keeps to a minimum the number of experiments while providing the information needed.

An example of the existent interactions between the factors can be seen in figure I.1. At high extraction time (130 min), better experimental responses were obtained in line with increasing stirring speed. This interaction indicates that a long sampling time produces the extraction of a larger number of volatile compounds when high stirring speed is used.

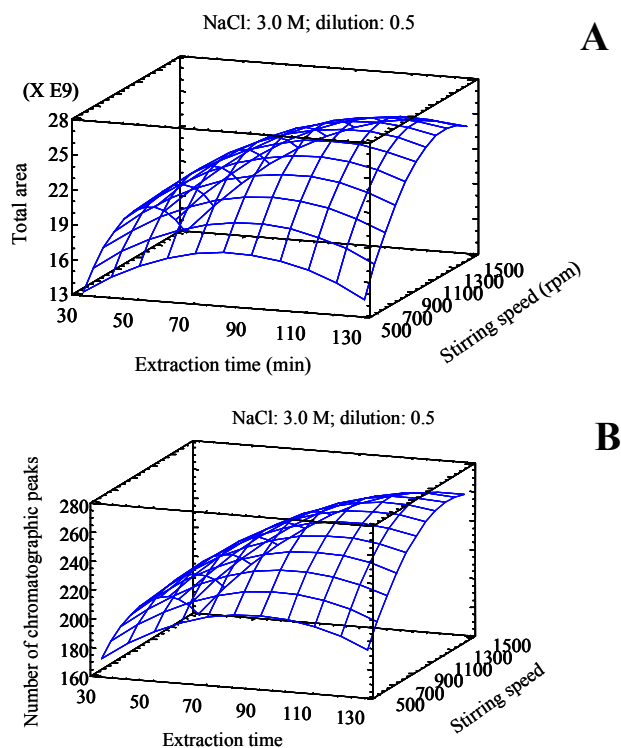


Figure I.1. Estimated Response surfaces for total chromatographic area (A) and number of chromatographic peaks (B) using the central composite design obtained by plotting extraction time vs. stirring speed. Extraction condition optimization.

After evaluation of the main factors and their interactions, the best conditions for extracting the volatile compounds of vinegar were: sample volume 25 mL without dilution, sampling time 120 minutes, NaCl content 5.85 g, and stirring speed 1250 rpm, and the optimum conditions for the desorption of volatile compounds of vinegar were: desorption temperature 330°C, cryofocusing temperature -140 °C, flow of helium 75 ml min⁻¹, and desorption time 10 min. Taking into account the specifications from the manufacturer, the desorption temperature was finally set at 300°C in order not to damage the stir bar.

REFERENCES

- [1] Rapp, H. Hastrich, L. Engel, *Vitis* 15 (1976) 29.
- [2] C. G. Edwards, R. B. Beelman, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 216.
- [3] C. Noble, R. A. Flath, R. R. Forrey, *J. Agric Food Chem.* 28 (1980) 346.
- [4] R. Castro, R. Natera; M. V. G. Moreno; C. G. Barroso, *J. of Chromatogr. A* 953 (2002) 7.
- [5] R. Natera; R. Castro; M. V. García-Moreno; C. G. Barroso; F. García Rowe, *J. of Chromatogr. A* 967 (2002) 261.
- [6] J. L. Wang and W. L. Chen, *J. of Chromatogr. A* 927 (2001) 143.
- [7] G. P. Blanch, G. Reglero and M. Herraiz, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1251.
- [8] G. P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz and J. Tabera, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 11.
- [9] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [10] V.M. León, B. Álvarez, M. A. Cobollo; S. Muñoz, I. Valor, *J. of Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [11] M. S. Garcia-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Water Research* 38 (2004) 1679.
- [12] S. Nakamura, S. Daishima, *J. of Chromatogr. A* 1038 (2004) 291.
- [13] J. Pawliszyn. *Solid phase microextraction-theory and practice.* Wiley, New York, 1997.
- [14] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 961.
- [15] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *J. of Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- [16] E. Morgan, *Chemometrics: Experimental Design*, Wiley, Chichester, 1991, pp 197-256.
- [17] R. G. Brereton, *Chemometric: Applications of mathematics and Statistics to Laboratory Systems*, Ellis Horwood, Chichester, 1990.

II. Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: validation study and comparison with solid phase microextraction.

The advantage of SBSE is the much higher mass of PDMS available, which results in high recoveries and a higher sample capacity. The applications developed with SBSE have shown low detection limits and good repeatability [1, 3-12], which confirm the great potential of this technique.

The purpose of the work reported here is to perform the validation of the previously optimized SBSE analytical method [1], as well as to compare it with a previous methodology based on SPME technique [2]. The method, after validation, has been applied to various different samples of commercial vinegars.

In the present study, 47 compounds have been studied and a complete validation study has been carried out, studying calibration and linearity, detection and quantitation limits, accuracy, repeatability, reproducibility and the possible matrix effect of the acetic acid content.

The procedure developed shows detection and quantitation limits, and linear ranges adequate for analysing this type of compounds. The accuracy obtained were close to 100%, with repeatability values lower than 13%. The extraction efficiency is inversely affected by the acetic acid content. Although the absolute areas decrease, the compound area/internal standard area ratio remains constant, so for quantitative analysis, the acetic acid concentration does not affect the analytical data, figure II.1.

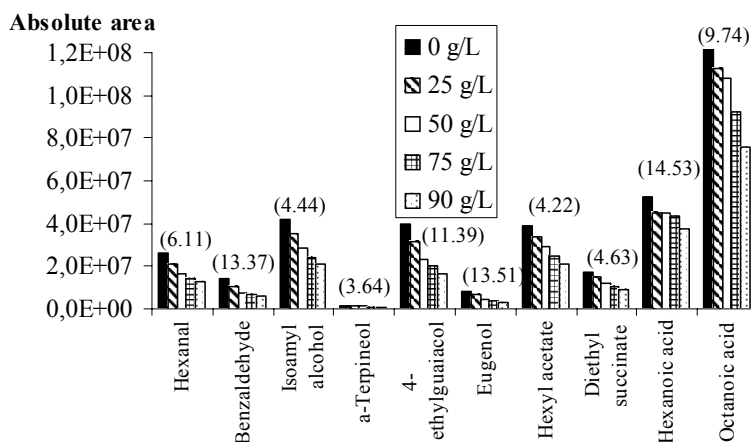


Figure II.1. Absolute molecular ion peak areas obtained for synthetic vinegar samples with different acetic acid content. Relative standard deviations in brackets (%) of the mean values of the relative areas (molecular ion peak area/internal standard area).

The SBSE analytical method validated here has been compared with a SPME methodology previously optimized by the same research group for the analysis of volatile compounds in vinegars [2]. Both analytical methods were used to analyse five vinegars supplied by different producers (Figure II.2). Not all the compounds measured

by SBSE are detected using the SPME technique, but those which are quantified by both methods present similar concentration values.

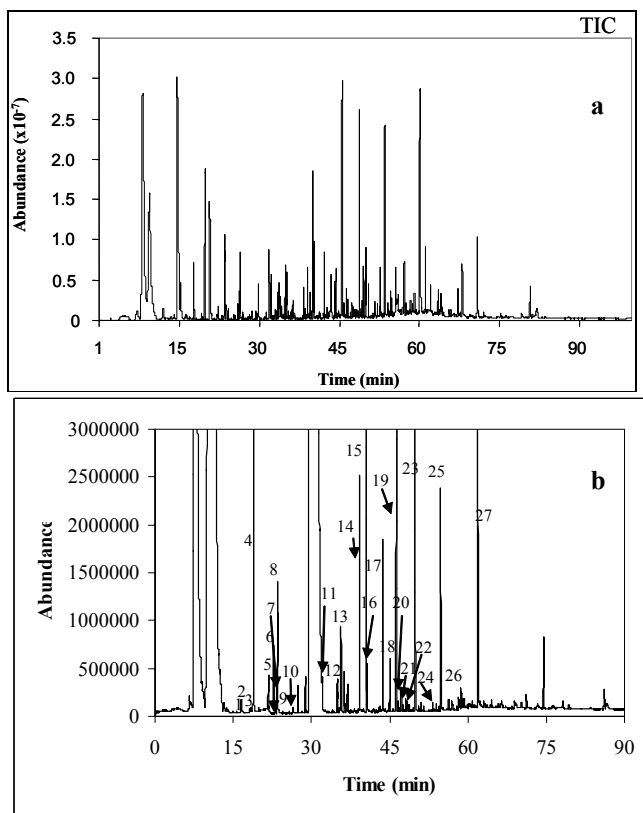


Figure II.2. Total ion chromatogram obtained for a vinegar sample by means of: (a) SBSE. Retention times (min): Ethyl isobutyrate (13.62); propyl acetate (13.99); isobutyl acetate (15.76); ethyl butyrate (16.84); n-butyl acetate (18.38); ethyl isopentanoate (18.46); hexanal (18.70); isobutanol (19.71); isopentyl acetate (20.57); ethyl pentanoate (20.77); 1-butanol (21.84); trans-2-hexenal (24.01); isoamyl alcohol (23.84); 2-methyl-1-butanol (24.12); ethyl hexanoate (24.65); hexyl acetate (25.80); 3-hydroxy-2-butanone (26.62); cis 3-hexenyl acetate (27.59); ethyl lactate (28.51); hexan-1-ol (28.87); cis-3-hexen-1-ol (30.04); trans-2-hexen-1-ol (30.82); ethyl octanoate (31.87); 2-furaldehyde (32.87); benzaldehyde (35.15); isobutyric acid (36.84); 5-methyl-2-furaldehyde (36.95); 2-acetyl-5-methylfuran (38.54); butyric acid (38.89); isovaleric acid (40.28); diethyl succinate (40.58); α -terpineol (41.51); benzyl acetate (42.64); ethyl-2-phenyl acetate (44.59); phenylethyl acetate (45.95); hexanoic acid (46.57); benzyl alcohol (47.03); 2-phenylethanol (49.21); 2-ethyl hexanoic acid (50.17); 4-ethylguaiaicol (52.87); octanoic acid (53.75); eugenol (57.21); 4-ethylphenol (57.36); 5-acetoxymethyl-2-furaldehyde (58.00); decanoic acid (60.39); diethyl ftalate (63.87); 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (68.90). (b) SPME. 1, n-butyl acetate; 2, ethyl pentanoate; 3, 2-methyl-1-propanol; 4, isoamyl acetate; 5, 4-methyl-2-pentanol (I.S.); 6, ethyl hexanoate ; 7, 2-methyl-1-butanol; 8, isoamyl alcohol; 9, hexyl acetate; 10, 3-hydroxy-2-butanone; 11, 2-furancarboxaldehyde; 12, benzaldehyde; 13, 2,3-butanediol; 14, ethyl decanoate; 15, isovaleric acid; 16, diethyl succinate; 17, 1,1,6 trimethyl-1,2-dihydro-naphtalene; 18, ethyl-2-phenyl acetate; 19, phenylethyl acetate; 20 hexanoic acid; 21, α -ionona; 22, benzyl alcohol; 23, 2-phenylethanol; 24, 4-ethylguaiaicol; 25, octanoic acid; 26, 4-ethylphenol; 27, decanoic acid.

Similar performance characteristics were obtained for both methodologies, with lower detection and quantitation limits and better repeatability reproducibility values for SBSE. Both analytical methods were used to analyse a variety of vinegars. The results obtained from both methods were in agreement (Table II.1)

Table II.1. Comparison of SPME and SBSE for the determination of volatile compounds in vinegars. Mean values ($\mu\text{g L}^{-1}$). First value for each compound was obtained by SBSE.

Compound	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	y = SBSE; x = SPME
n-Butyl acetate*	78.15	25.52	8.65	nd	nd	y= 1.0743x - 0.0027
	74.92	23.99	8.34	nd	nd	(r ² = 0.9999)
Isoamyl alcohol*	63.16	279.27	235.56	74.19	130.30	y= 0.9756x - 0.1980
	65.18	283.56	232.14	73.14	128.45	(r ² = 0.9812)
Isobutanol*	4.03	8.20	5.06	8.03	4.07	y= 1.0348x - 0.0480
	4.00	7.75	5.01	8.04	4.02	(r ² = 0.9908)
Isopentyl acetate*	3.20	2.37	3.56	3.59	0.90	y= 0.9506x + 0.0489
	3.03	2.46	3.87	3.50	0.92	(r ² = 0.9787)
Ethyl pentanoate	19.01	nd	nd	3.10	25.00	y= 1.0287- 0.001
	19.01	nd	nd	3.03	24.11	(r ² = 0.9988)
2-Methyl-1-butanol*	10.21	6.16	8.01	19.76	6.17	y= 0.9513x + 0.4387
	9.76	6.17	7.87	20.46	6.24	(r ² = 0.996)
Isoamyl alcohol*	9.70	5.61	6.41	16.28	2.19	y= 0.9163x + 0.8125
	8.91	5.17	6.11	17.89	2.13	(r ² = 0.9938)
3-Hydroxy-2-butanone*	508.74	424.76	322.02	120.55	443.13	y= 0.9924x -0.7747
	509.51	451.79	302.10	130.86	438.14	(r ² = 0.9868)
<i>cis</i> 3-Hexenyl acetate	0.41	nd	nd	nd	0.51	-
	nd	nd	nd	nd	nd	-
2-Furaldehyde*	5.31	7.72	5.89	3.98	2.72	y= 0.9454x + 0.3226
	4.72	7.71	5.81	4.40	2.48	(r ² = 0.9953)
Benzaldehyde*	0.06	0.12	0.68	0.04	0.40	y= 1.0937x - 0.0113
	0.07	0.13	0.62	0.05	0.40	(r ² = 0.9962)
Isovaleric Acid*	16.26	25.19	146.61	74.47	180.84	y= 1.0360x+ 0.5134
	14.62	25.65	134.93	72.35	178.06	(r ² = 0.9980)
Diethyl succinate*	0.21	2.79	0.40	1.49	0.31	y= 0.9141x - 0.0132
	0.22	2.89	0.46	1.91	0.28	(r ² = 0.9817)
Benzyl acetate	7.05	1.91	21.44	1.91	5.34	y= 0.8911x - 0.0287
	7.45	2.12	28.99	2.45	5.99	(r ² = 0.9908)

Table II.1 (cont.)

Compound	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	y = SBSE; x = SPME
Ethyl-2-phenyl- acetate	11.82	1147.77	24.96	9.18	nd	y= 1.0184x - 0.0004
	12.56	145.49	24.22	9.58	nd	(r ² = 0.9990)
Phenylethyl acetate*	0.21	0.21	0.18	1.97	4.16	y= 0.9874x - 0.0485
	0.21	0.22	0.17	2.22	4.05	(r ² = 0.9848)
Hexanoic acid*	1.23	1.33	2.46	0.30	0.95	y= 0.9400x + 0.0929
	1.13	1.35	2.55	0.27	0.90	(r ² = 0.9939)
Benzyl alcohol*	1.93	0.47	1.86	2.73	0.47	y= 0.9380x + 0.0325
	2.13	0.48	1.95	2.80	0.44	(r ² = 0.9961)
2-Phenylethanol*	31.05	11.02	58.23	22.49	19.55	y= 0.9169x + 0.7095
	33.50	12.12	62.09	22.18	20.24	(r ² = 0.9972)
4-Ethylguaiaicol	9.30	154.51	125.56	nd	nd	y= 0.9608x + 0.0056
	9.56	161.63	126.82	nd	nd	(r ² = 0.9942)
Octanoic acid*	0.15	1.94	0.60	1.81	2.16	y= 0.9444x + 0.0691
	0.14	1.78	0.54	1.95	2.26	(r ² = 0.9866)
4-Ethylphenol	237.54	62.84	749.38	130.05	12.04	y= 0.9309x + 0.0025
	267.81	56.16	798.90	129.80	14.22	(r ² = 0.9990)
Decanoic acid	55.21	31.14	131.12	126.21	92.04	y= 0.9404x + 0.0043
	56.41	32.61	129.53	124.68	91.50	(r ² = 0.9905)

nd= not detected

* mg L⁻¹

REFERENCES

- [1] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 47.
- [2] R. Natera, R. Castro, M.V. García-Moreno, F. García Rowe, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 967 (2002) 261.
- [3] J. Marín, A. Zalacain, C. De Miguel, G.L. Alonso, M.R. Salinas, J. Chromatogr. A. 1098 (2005) 1.
- [4] M.S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara. Water Res. 38 (2004) 1679.
- [5] F. Luan, A. Mosandl, A. Münch, M. Wüst, Phytochemistry 66 (2005) 295.
- [6] F. Luan, A. Mosandl, M. Gubesch, M. Wüst, J. Chromatogr. A 1112 (2006) 369.
- [7] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, J. Agr. Food Chem. 50 (2002) 449.
- [8] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 948.
- [9] A. Buettner, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 2339.
- [10] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 11.

- [11] J.C.R. Demyttenaere, J.I.S. Martinez, R. Verhe, P. Sandra, N. De Kimpe, J. Chromatogr. A 985 (2003) 221.
- [12] A. Isogai, H. Utsunomiya, R. Kanda, H. Iwata, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 4118.

III. Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of pesticides in vinegars.

In spite of the trends towards adopting more ecological approaches in agriculture, it is still necessary to employ phytosanitary products in order to ensure both the required quality and quantity of very many crops. Pesticides are used on agricultural products such as grapes and wine grapes, and consequently some of these compounds can be carried through the production process and into the finished wine [1] or wine vinegar. For every common pest there exists a wide range of pesticides, of different chemical families, each with a different form of action [2]. Many products are recommended for the control of pests and diseases of the grapevine, and in one or other way, these may persist throughout the various stages of production, into the finished vinegar. Most authorized insecticides and acaricides belong to the group of organophosphorous compounds, and these are also used mixed with oils for treatments applied during winter; most of the fungicides used belong to the families of thiocarbamates, phthalimides, benzimidazoles and dicarboximides. Among the herbicides, the most commonly used are triazines and phenylureas [3]. When a phytosanitary treatment is applied a certain amount of the substance remains on the plant, and it is called pesticide deposit. This quantity of pesticide diminishes progressively over time, until the grapes are harvested, when only a small residue can be found. The most problematic pesticides are those applied close to the harvest such as the antibotyrics [1]. The appearance of pesticide residues in wine, and therefore in the final vinegar, depends on several factors, as many as the number of stages comprising the production process [4].

In Spain, pesticide residues are not directly legislated in wine, but are generally regulated through the various national standards for foodstuffs, as a maximum residue limit (MRL) on the viniferous grapes. Today there is a trend to lower the MRL to be separate strictly for wine. The legislation is reducing the maximum permitted quantity of pesticides, with a clear intention to reach “zero tolerance” [5, 6]. This trend has also been observed in vinegar and an increasing number of products are appearing on the market with the label: “ecological product”. Another factor is the aromatic quality of the wine, and therefore of the vinegar, which can be modified by the presence of pesticide residues during the fermentation [7-9]. The presence of pesticide residues and their degradation products may also influence negatively the stability of the finished wine, producing colloidal haze [10].

Therefore it is considered of commercial interest to possess reliable and sensitive methods for determining the levels of phytosanitary products in vinegars, not only because of the adverse effect their occurrence could have on the organoleptic characteristics of the vinegar [11], or because of the risk to public health that a large quantity of these residues could represent, but also for its implication in obtaining the denomination of “ecological vinegar”.

Numerous analytical methods have been developed for the determination of pesticides in wines by gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC). Generally prior to the chromatographic separation, a sample treatment is required [12-17]. Most of these are time and solvent consuming. Solvent-free sample preparation techniques based on sorptive extraction, have been demonstrated to be good alternatives to traditional methods such as liquid extraction [18].

The present chapter describes the optimization and validation of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption procedure coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pesticide residues in vinegar. Some previous applications of this technique to the analysis of pesticides in wine can be found [20, 21], but it has never been applied to vinegar samples.

Time of extraction, sample volume, stirring speed and the addition of different amounts of NaCl were evaluated to reach the best overall analytical conditions. The factor extraction temperature has a significant influence on the SBSE efficiency, but a high temperature reduces the lifetime of the PDMS phase [22], so in this work, the extraction temperature was set at 25 °C. In this study, the desorption condition optimization (desorption time and temperature, helium flow and cryofocusing temperature) was not considered taking into account that in a previous work [19] we found that they had only a modest effect on chromatographic signals. After optimization, the proposed analytical conditions are: sample volume 40 mL, sampling time 150 minutes, and stirring speed 1000 rpm. On the basis of the results, it was decided not to add NaCl.

This developed analytical method was applied to analyse commercial vinegar samples from different raw materials (sherry and non-sherry wine vinegars, apple vinegars and balsamic vinegars) and different periods of ageing in wood. Each sample was analysed in triplicate. The mean results obtained are shown in table III.1. In the bibliography no data are available concerning concentrations of pesticides in vinegars. Cyprodinil and fludioxonil were found in concentrations ranging from 0.9 to 28.6 µg/L in Galician white wines [23]. Scarponi and Martinetti [24] determined these same fungicides in Italian white and rosé wines at levels of 30 µg/L for cyprodinil and 34 µg/L for fludioxonil. Iprodione and vinclozolin were found in several wines analysed by Pietschmann et al. [25]. In the case of Italian white and red wines, about 57% of the wines studied were positive for one or more pesticides usually used on grapes [26]. In our case, most of the pesticides were not detected or their concentrations were lower than the calculated quantitation limits. The highest concentrations for several pesticides were found in balsamic vinegars, ranging from 146.21 µg/L for metalaxyl to 2.91 µg/L for pyrimethanil. As can be seen, only small amounts of the pesticides used on the grapes and/or apples appear in commercial vinegars due, possibly, to their degradation and precipitation during fermentation and clarification processes [27].

Table III.1. Pesticide residues ($\mu\text{g/L}$) found in commercial vinegars.

Compound	Sherry vinegars		Non-sherry wine vinegars		Apple vinegars		Balsamic vinegars	
	1	2 ^a	3	4	5	6	7	8 ^a
Pyrimethanil	<D.L.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22.28	2.91
Flufenoxuron	n.d.	n.d.	<D.L.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.
Chlorpyriphos-methyl	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.
Vinclozolin	n.d.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	n.d.	<D.L.
Metalaxyl	n.d.	n.d.	186.03	n.d.	n.d.	n.d.	146.21	32.82
Fenitrothion	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.
Malathion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dicofol	<D.L.	<D.L.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorpyriphos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.	n.d.
Cyprodinil	n.d.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	2.95	8.90	3.43
Triadimenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29.87	n.d.
Procymidon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.50	3.61
Hexythiazox	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fludioxonil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.62	n.d.
Iprodion *	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.71	n.d.
Benalaxyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.	n.d.	n.d.
Fenhexamid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.27	n.d.

*: Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin

^a: aged vinegars

n.d.: not detected

<D.L.: under detection limit

REFERENCES

- [1] C. Sala, F. Foro, O. Busto, F. Zamora, L. Arola, J. Guasch, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 3668.
- [2] C. De Liñán, Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales, Ediciones Agrotécnicas, 2000.

- [3] P. Cabras, A. Angioni, *J. Agric. Food Chem.* 48(4) (2000) 967.
- [4] H. Otteneder, P. Majerus, *Bulletin de l'O.I.V.* 78(889-890) (2005) 173.
- [5] C.M. Cooney, *Environ. Sci. Technol.* 30(9) (1996) 380A.
- [6] J. A. Pascual, M. Ros, P. Fernández, A. Bernal, A. Lacasa, *Internantional Conference on Waste Management and the Environment II*, V. Popov, Greece, 2004 ; p. 251.
- [7] J. Oliva, M.A. García, S. Navarro, F. Pardo, A. Barba, *Enólogos, Investigación y Ciencia* 9 (2001) 18.
- [8] M.A. García, J. Oliva, A. Barba, M.A. Cámara, F. Pardo, E.M. Díaz-Plaza, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1241.
- [9] C. Aubert, R. Baumes, Z. Günata, J.P. Lepoutre, J.F. Cooper, C. Bayonove, *Journal International des Sciences de la Vigne and du Vin*, 1997.
- [10] I. Guguchkina, N.M. Ageeva, *Sadovodstvo I Vinogradarstvo I Vinodelie Moldovy*, 12 (1990) 34.
- [11] J. Oliva, S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, M. R. Salinas, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2830.
- [12] P. Cabras, C. Tuberoso, M. Melis, M.G. Martini, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 817.
- [13] G.E. Miliadis, N.G. Tsiropoulos, P.G. Aplada-Sarlis, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 113.
- [14] L.F. López, A.G. López, M.V. Riba, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 684.
- [15] M.L. Hopper, *J. AOAC Int.* 71 (1988) 731.
- [16] A.M. Vitali, M. Guidotti, R. Giovinazzo, O. Cedrone, *Food Addit. Contam.* 25 (1998) 280.
- [17] M. Correia, C. Delerue-Matosb, A. Alves, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 59.
- [18] R. Castro, R. Natera, P. Benítez, C.G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004), 141.
- [19] E. Duran, R. Natera, R. Castro, C. Garcia Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104(1-2) (2006) 47.
- [20] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 117.
- [21] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [22] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, *J. Chromatogr. A*, 1095 (2005) 1.
- [23] R. Rail, C. Yagüe, B. Cancho, J. Simal, *J. Chromatogr. A*, 942 (2002) 41.
- [24] L. Scarponi, L. Martinetti, *Vigne vini* 1 (1999) 27.
- [25] M. Pietschmann, H. Hupf, A. Rapp, *Lebensmittelchemie* 54 (2000) 102.
- [26] M. Vitali, M. Guidotti, R. Giovinazzo, O. Cedrone, *Food Addit. and Contam.* 15 (1998) 280.
- [27] G.J. Soleas, D.M. Goldberg, *J. Wine Res.* 11 (2000) 197.

IV. Solid-phase extraction method for determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar.

Traditional balsamic vinegar of Modena and Reggio-Emilia (TBV) is a typical product of the Emilia-Romagna region in the north of Italy. It is manufactured from the juice of white grapes (typically, trebbiano grapes) boiled down to approximately 50% of its original volume to obtain a concentrated must, which is then fermented with a slow aging process which concentrates the flavours. The flavour intensifies over decades, with the vinegar being kept in fine wooden casks, and the final product is sweet, viscous and very concentrated. TBV is very labour-intensive to produce; while it ages and gradually evaporates thanks to wood porosity, the liquid is transferred to successively smaller casks made of different woods, becoming more concentrated with each transfer. Oak, mulberry, chestnut, cherry, juniper, ash, and acacia are the most commonly used woods each of them with a typical porosity and aromatic impact. At the end of the process, the vinegar is taken from the smallest cask: each cask is filled with the contents of the preceding (larger) cask and the cooked must is added to the largest cask. TBV is world wide appreciated for its extremely high certified quality, therefore its physicochemical properties have been studied by several authors for what concern carboxylic acids [1], phenolic acids [2] furanic compounds [3], microbiology [4,5], heavy metals [6], as well as the study of the relationships among different parameters [7-9].

In complex matrixes subjected to aging processes, the study of the aroma plays a fundamental role in the quality of the final product. In the case of TBV, due to its complexity only a few references related to the analysis of volatile compounds exist [10-13]. Consequently, even today the extraction and concentration of volatile compounds in TBV, which are essential steps when analysing volatiles by means of GC, constitute a problem that has still not been satisfactorily resolved. In particular, the high percentage of acetic acid present in TBV involves a serious problem, either over the chromatographic response, due to its elevated signal, or over the SPE extraction process, because it of itself acts as a solvent [14].

The present chapter describes the development (optimization and validation) of a solid-phase extraction method with posterior capillary gas chromatographic-mass spectrometric detection applied to the determination of volatile compounds in TBV. The optimization of the extraction conditions has been carried out by means of an experimental design. This design allows the simultaneous variation of all experimental factors studied, and the detection of possible interactions among them that could have influence in the final result that are not detectable with the classical experimental methods [15-16]. Taking into account the complexity (an extraordinary density and the previously mentioned high content of acetic acid) of our matrix, sample amount, eluent volume, washing water volume and dilution of the sample were evaluated. The effects of these parameters were investigated using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. The juxtaposition of a two-level design with a star design (the centres of the two designs coincide) gives the mentioned composite design. It is one of the most useful designs for estimating a multifactor response surface and has been previously used with excellent results for the study of volatile compounds and pesticides in Sherry wine vinegars [17-18].

After considering all the main factors and their interactions, the best conditions for extracting volatile compounds of TBV are: 7 g of sample, 5 ml of washing water, a dilution of 1:4 and 10 ml of eluent. These conditions, therefore, represent an optimal compromise between extraction efficiencies, SPE elution time, reduced volumes of organic solvent and reasonable cost in terms of sample amount needed for analysis (considering that the commercial price of TBV ranges between 80 and 120 €/100 ml).

The limits of detection (three times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) and quantitation (ten times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) obtained are low enough to determine these compounds in traditional balsamic vinegar samples according to the values found for them in the bibliography [10].

The relative standard deviations (RSD) for the intra-day precision ranged between 1.55% and 21.80% (the higher RSD being verified for those compounds with lower recoveries) whereas the inter-day precision showed values of RSD between 0.50% and 25.63%. However, the majority of compounds presented values under 15% while, the high values of RSD, above all in the intra-day study had also been reported by other authors [19].

Under the optimized conditions used in this study, SPE can be considered an appropriate technique for the extraction of this type of compounds from matrixes with the level of complexity of TBV (Figure IV.1).

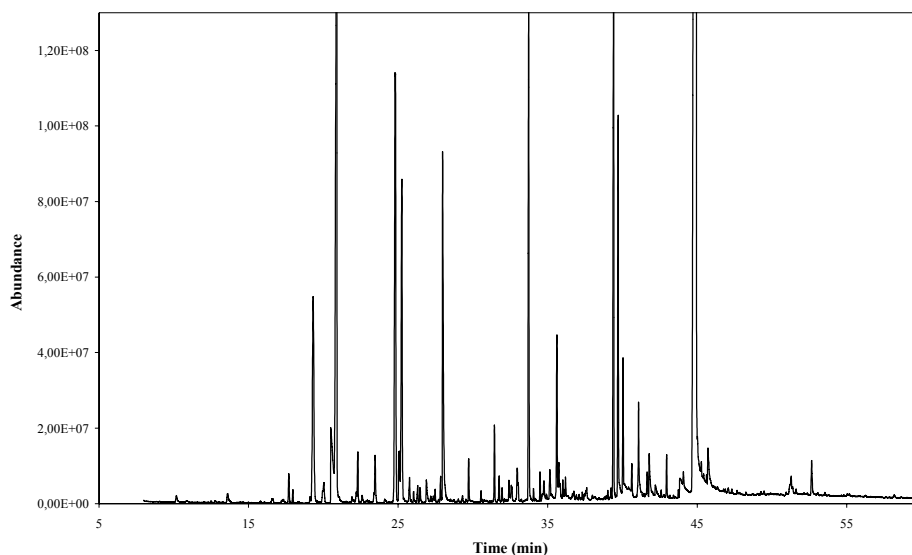


Figure IV.1. Total ion chromatogram obtained for TBV by means of SPE-GC-MS. Retention times (min): Isoamyl alcohol (10.79); 3-hydroxy-2-butanone (13.53); ethyl lactate (16.01); 3-ethoxy-1-propanol (17.26); furfural (20.8); benzaldehyde (22.8); γ -butirolactone (26.29); isovaleric acid (27.96); diethyl succinate (27.96); ethyl 2-phenylacetate (30.73); guaiacol (32.52); benzylalcohol (32.94); 2-phenylethanol (33.71); whiskeylactone (34.47); maltol (34.76); eugenol (38.77); 4-ethylphenol (39.01); syringol (40.63); 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (44.75); phenylacetic acid (45.74); hexadecanoic acid (50.93).

REFERENCES

- [1] M. Cocchi, P. Lambertini, D. Manzini, A. Marchetti, A. Ulrichi, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5255.
- [2] M. Plessi, D. Bertelli, F. Miglietta, J. Food Compos. Anal. 19 (2006) 49.
- [3] F. Chinnici, F. Masino, A. Antonelli, J. Chromatogr. Sci. 41 (2003) 305.
- [4] L. De Vero, E. Gala, M. Gullo, L. Solieri, S. Landi, P. Giudici, Food Microbiol. 23 (2006) 809.
- [5] L. Solieri, S. Landi, L. De Vero, P. Giudici, J. Appl. Microbiol. 101(1) (2006) 63.
- [6] F. Corradini, L. Marcheselli, G. Franchini, A. Marchetti, C. Preti, C. Biancardi, J. AOAC Int. 77 (1994) 714.
- [7] A. Antonelli, F. Chinnici, F. Masino, Food Chem. 88 (2004) 63.
- [8] F. Masino, F. Chinnici, G.C. Franchini, A. Ulrici, A. Antonelli, Food Chem. 92 (2005) 673.
- [9] F. Masino, F. Chinnici, A. Bendini, G. Montevicchi, A. Antonelli, Food Chem. 106 (2008) 90.
- [10] G. Zeppa, M. Giordano, V. Gerbi, G. Meglioli, Ital. J. Food Sci. 3(14) (2002) 247.
- [11] A. Del Signore, J. Food Eng. 50 (2001) 77.
- [12] M. Cocchi, C. Durante, M. Grandi, D. Manzini, A. Marchetti, Talanta 74 (2008) 547.
- [13] M. Cocchi, C. Durante, G. Foca, D. Manzini, A. Marchetti, A. Ulrici, Chemometr. Intell. Lab. 71 (2004) 129.
- [14] Lee, M., Oh, S. Y., Pathak, T. S., Paeng, I. R., Cho, B.Y., Paeng, K. J., *J. Chromatogr. A* 2007, 1160, 340-344
- [15] E. Morgan, *Chemometrics: Experimental Design*, Wiley, Chichester, 1991, p. 197.
- [16] R. G. Brereton, *Chemometric: Applications of mathematics and Statistics to Laboratory Systems*, Ellis Horwood, Chichester, 1990.
- [17] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1104(1-2) (2006) 47.
- [18] E. Durán, R. Castro, R. Natera, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1165 (2007) 144.
- [19] R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, J. Chromatogr. A 966 (2002) 167.

APPLICATIONS TO PRODUCTION PROCESSES

I. Control of Sherry wine vinegar's acetic fermentation process by means of SBSE-GC-MS and FT-IR.

In recent years numerous methods have been developed for the individual determination of compounds of interest in wine and related drinks, employing the technique of mid infrared as the system of measurement, usually using Fourier Transform based instruments [1-3]. The basic reasons for interest in this methodology are the rapidity of the analysis, the lack of need for sample preparation, and the absence of residues generated by not employing reagents for the determinations. These characteristics make it an appropriate technique for developing vanguard/rearguard analytical strategies in the control of productive processes [4], such that the need for particular corrective actions can be judged in the shortest possible time.

One process where the rapid application of corrective actions is very important is the performance of acetic fermentation in the production of vinegar. Wine vinegar is produced industrially mainly using a semi continuous process in which a fraction of the total volume produced is withdrawn [5,6]. The remaining volume, which acts as the inoculant for the next cycle, is topped up with fresh wine, added in successive portions, to obtain the final working volume.

These processes are carried out over periods of 24-48 hours during which large quantities of wine, as original material, are utilised. Although the basic objective of the process of acetic fermentation is the transformation of ethanol into acetic acid by the metabolism of the acetic bacteria, several other chemical and biochemical processes, which will characterise the final product, take place in parallel. Among these processes, the formation and rupture of ester-type bonds, the generation of furfurals, the release or formation of bonds with the higher alcohols present are of special interest. All these components contribute to the final characteristics of vinegars produced and therefore their generation or elimination needs to be controlled. Methods of determination by Gas Chromatography [7,8] can be employed for this; however, although these methods are rapid, they require more time than would be available for applying any necessary corrective actions.

Rapid methods of the spectroscopic type have been developed for the control of this process on the industrial scale; in some, only the consumption of ethanol by the bacteria is determined in-line [9], in others the near infrared (NIR) technique has been employed for the simultaneous control of ethanol, acetic acid, ethyl acetate and acetoin [10]. In fact, it has been demonstrated that the NIR technique is valid for the determination of various parameters of interest in samples of vinegar [11]. However, FT-IR (Fourier Transform InfraRed), a new technique being introduced increasingly in the laboratories of wine producers, has not been evaluated as a system for the control of vinegar production, since no references to this can be found in the bibliography. Nevertheless, its validity has been demonstrated in the control of production of other related drinks [12,13].

The objective of this chapter is to describe a method based on FT-IR developed for the monitoring and control of the industrial acetic fermentation process, in which the compounds that are generated or eliminated during this process, as well as the majority

compounds, esters, furfurals and alcohols are measured. This volatile composition of the process was analysed using the previously developed SBSE-GC-MS method [7, 8].

During the acetic fermentation process, the behaviour of the compounds of interest is related to their chemical structure. Hence, in order to obtain a greater degree of reliability in the correlations between their concentrations and the infrared spectra, compounds were grouped according to their chemical structure; and so the sum of the concentrations was studied in respect of the following groups of compounds: ethyl esters, higher alcohols, fatty acids, acetates and furfurals. The evolution of the compounds within each of these families (figure I.1) is conditioned more by its base structure than by its peculiarities within each family; therefore an estimation of the concentration by families can be a useful indication of the development of the acetic fermentation process.

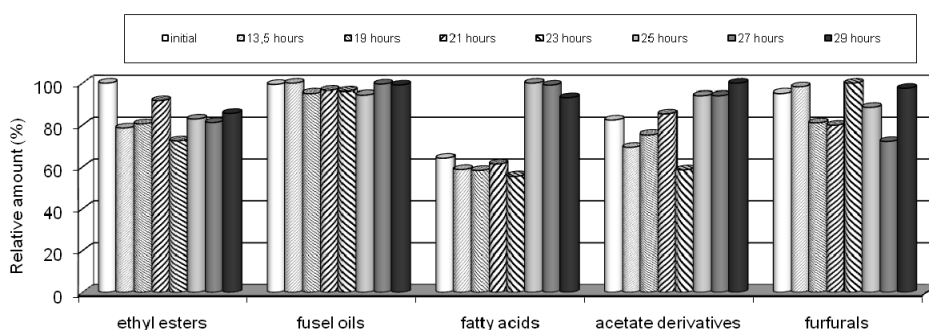


Figure I.1. Evolution of the groups of compounds once the total volume of wine to be acetified has been reached. The data shown correspond to an acetic fermentation process performed in a large volume (26000 L) tank.

The calibration was applied by means of PLS between the values of each of the groups of compounds specified before and the values of absorbance at each frequency of the spectrum. The results obtained employing the complete spectrum are shown in table I.1.

Table I.1. Results of the calibration by PLS for each of the groups of compounds

Parameters	Intercept	Slope of the curve	RMSEC	SEC	Zones of the spectrum with a greater degree of participation (cm ⁻¹)
ethyl esters	1.536	0.987	0.23	0.24	1438-1550
fusel oils	-548	0.999	11	12	1076-1585
fatty acids	94	0.999	915	953	1349-1550
Acetate derivatives	0.002	0.999	0.13	0.14	1801-2788
Furfurals	0.001	0.999	0.35	0.36	1824-2858

In the light of the results of the calibration by PLS, it is feasible to obtain a good correlation between the mid infrared spectra and the results of the GC analysis during the evolution of the acetic fermentation process. This finding is particularly notable in the case of the acetates and ethyl esters since, despite the large variations presented by

acetic acid and ethanol, the mid-IR spectrum includes zones of absorption where the signals corresponding to the cited esters can be detected selectively, without any apparent interference due to these majority compounds.

The calibrations performed have enabled reliable estimates to be made for the sum of the ethyl esters and higher alcohols present during the acetic fermentation process. In the case of the other three groups of compounds studied, the errors found enable approximate estimates to be made. With these results, FT-IR is put forward as a valid technique for monitoring the acetic fermentation process, and for controlling it on-line, on the basis of the production and variation of components related to the quality of the vinegar.

REFERENCES

- [1] V. Dixit, J. C. Tewari, B. K. Cho, J. M. K. Irudayaraj. *Appl. Spectrosc.* 59 (2005) 1553.
- [2] H. H. Nieuwoudt, B. A. Prior, I. S. Pretorius, M. Manley, F. F. Bauer. *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3726.
- [3] C. D. Patz, A. Blieke, R. Ristow, H. Dietrich. *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 81.
- [4] M. Valcárcel, S. Cardenas. *TRAC-Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 67.
- [5] W. Tesfaye, M. L. Morales, M. C. García-Parrilla, A. M. Troncoso. *Trends Food Sci. Tech.* 13 (2002) 12
- [6] S. Arnold, T. Becker, A. Delgado, F. Emde, A. Enenkel. *J. Biotech.* 97 (2002) 133.
- [7] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C. G. Barroso. *J. Chromatogr. A.* 1104 (2006) 47.
- [8] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C. G. Barroso. *J. Chromatogr. A.* 1167 (2007) 18.
- [9] I. García, D. Cantero, C. Jiménez, S. Baena, J. Jiménez, I. Santos, J. Bonilla, F. Barja. *J. Food Eng.* 80 (2007) 460
- [10] D. Garrido, I. Esteban, N. Pérez, J. M. González, C. Pizarro. *J. Near Infrared Spectrosc.* 12 (2004) 15
- [11] M. J. Saiz-Abajo, J. M. González-Saiz, C. Pizarro. *Food Chem.* 99 (2006) 615.
- [12] S. A. Kupina, A. J. Shrikhande. *Am. J. Enol. Vitic.* 54 (2003) 131.
- [13] M. Palma, C. G. Barroso. *Talanta* 58 (2002) 265.

II. Differentiation and classification of vinegars from different raw materials.

Products available as “vinegar” on the market are from different raw materials and production processes. In some cases, these production processes include a period of aging in wood. Wine vinegar is obtained from the acetification process of white or red wines. Its acidity is 6% or higher and its alcohol content is lower than 1.5%.

Among them, Sherry wine vinegar, from the Jerez-Xérès-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar and Vinagre de Jerez Denomination of Origin region (SW Spain), is obtained from sherry wines following traditional methods of acetification [1]. Industrial or semi-industrial Modena Balsamic vinegar is obtained by blending concentrated must and aged vinegar. And cider vinegar, made from apples. Others vinegars, from malt, honey, and other carbohydrate substrates can be found.

As important as obtaining a specific quality vinegar is the need to determine objectively the appropriate parameters that allow us to characterize and differentiate one vinegar from another. Various studies can be found into the bibliography with the objective of characterize or differentiate this product. Antonelli et al. [2] used the polyalcohols content to differentiate vinegars from various raw materials; García – Parilla et al. [3] employed polyphenolic compounds; Casale et al. [4] and Pizarro et al. [5] used volatile compounds in order to differentiate vinegars from different raw materials and production process (with or without aging in wood).

With the same objective, Natera et al., [6] developed several pattern recognition approaches that permit the classification of vinegar samples according to raw material (wine, cider, alcohol, etc.) and production process, using different analytical parameters, such as polyphenolic content, organic acids, and volatile compounds. In this study, a major role of the volatile compounds in the differentiation of the vinegar samples according to aging in wood was observed.

As can be seen, several physicochemical parameters (polyalcohols, polyphenols, volatile compounds, organic acids, etc.) have been employed to characterize vinegars from different origins. Despite the good results obtained in these works, it is important to take into account that the most of the analytical methodology used in them requires a lot of time and work.

In recent years, several methods of infrared spectroscopy have gained wide acceptance in different yields. These methods are characterized by their high rapidity, the absence of a previous stage of sample preparation and their cleanness by not employing reagents for the determinations.

In recent years numerous methods have been developed for the individual determination of compounds of interest in wine and related drinks, employing the technique of mid infrared as the system of measurement, usually using Fourier Transform based instruments [FT-IR; 7-9] and the near-infrared spectroscopy [NIR; 10-13]. On the other hand, both of them have also been employed in combination with pattern recognition methods to discriminate between wines or other enological products belonging to different groups [14-18].

Scarce literature can be found into the bibliography about the use of FT-IR together with pattern recognition techniques in order to discriminate vinegars from different origins. Only, Del Signore [19] used Mid-IR spectra to correctly classify traditional and non traditional balsamic vinegars.

The objective of this work is to study the potential use of FT-IR spectroscopy combined with multivariate techniques to differentiate vinegar samples from different production processes (with or without aging in wood) and raw materials. In a previous study [6], a good classification of several vinegar samples was obtained using different analytical parameters, such as polyphenolic content, organic acids, and volatile compounds. Taking into account these earlier results, a study comparative of classification using both methodologies (FT-IR and various analytical parameters) has been also carried out.

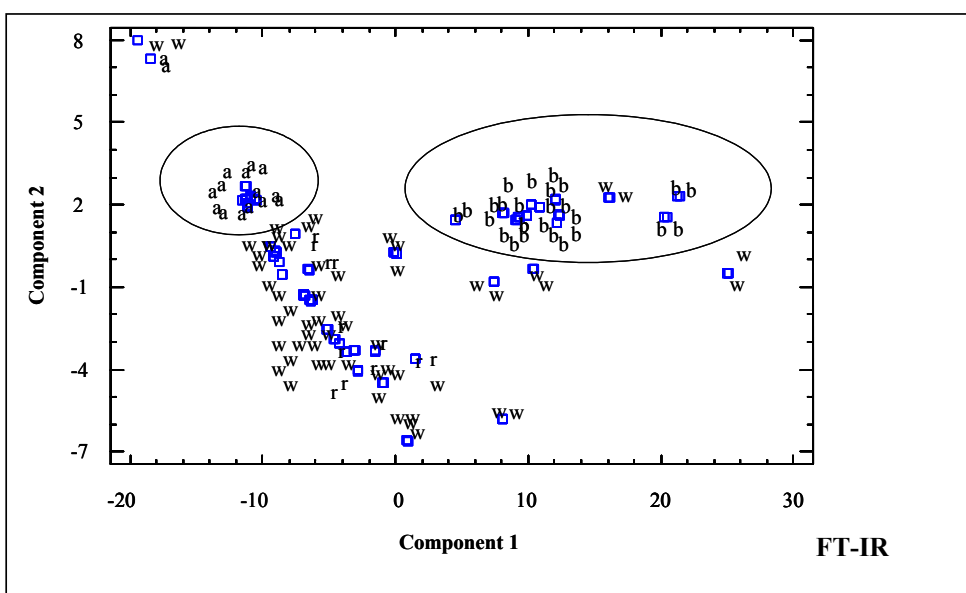


Figure II.1. PCA score plot based on FT- IR spectra of the vinegar samples. a: apple vinegar; w: white wine vinegar; r: red wine vinegar; b: balsamic vinegar.

In figure II.1, a good separation between balsamic (from cooked must) and apple vinegars can be observed. White and red wine vinegars are situated between them. No separation between white and red wine vinegar with or without aging in wood was obtained. White wine vinegars from Jerez (Sherry vinegar) were intermingled together with white wine vinegars from others geographic zones (no sherry vinegar).

On the other hand, as can be seen in figure II.2, the first component (PC1) separates the samples into three groups: vinegars from apple, with negative values for this PC; vinegars from wine, and vinegars from cooked must (balsamic vinegars) with positive values for PC1.

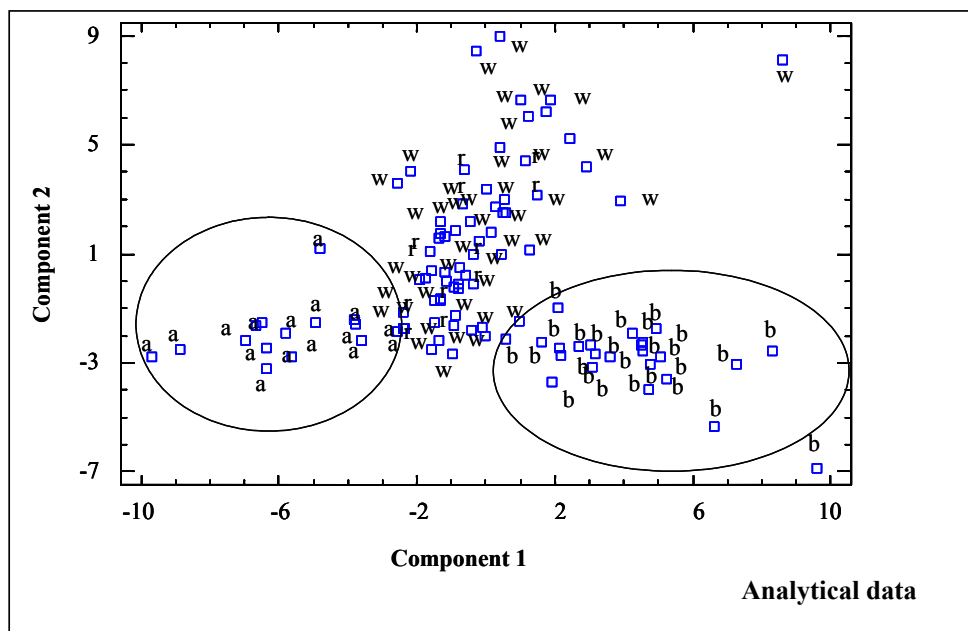


Figure II.2. PCA score plot based on analytical data of the vinegar samples. a: apple vinegar; w: white wine vinegar; r: red wine vinegar; b: balsamic vinegar.

In conclusion, these results demonstrated that mid-IR spectroscopy is able to classify vinegar samples from different raw materials and process of production (with and without aging in wood). The correct classification percentages obtained were similar to those obtained using several analytical parameters. This fact in sum to several advantages of this technique (rapidity, non-destructive, low cost, no sample preparation, no qualified laboratory personnel, etc.) turns it into a promising tool in order to the classification of vinegars from different raw materials and process of production with a similar degree of reliability to those obtained using several analytical parameters which are characterised by involving a high cost and time consuming.

REFERENCES

- [1] J. M. Quirós, *Quad. Scuola Spec. Vitic. Enol.* 2 (1990) 115.
- [2] A. Antonelli, G. Zeppa, V. Gerbi, A. Carnacini, *Food Chem.* 60 (1997) 403.
- [3] M. C. García-Parrilla, G. A. González, F. J. Heredia, A. M. Troncoso, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3487.
- [4] M. Casale, C. Armanino, C. Casolino, C. C. Oliveros, M. Forina, *J. Agric. Food Chem.* 12 (2006) 223.
- [5] C. Pizarro, I. Esteban-Díez, C. Sáenz-González, J. M. González-Sáiz, *Anal. Chim. Acta* 698 (2008) 38.
- [6] R. Natera, R. Castro, M. V. García-Moreno, C. García-Barroso, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3345.
- [7] V. Dixit, J. C. Tewari, B. K. Cho, J. M. K. Irudayaraj, *Appl. Spectrosc.* 59 (2005) 1553.
- [8] H. H. Nieuwoudt, B. A. Prior, I. S. Pretorius, M. Manley, F. F. Bauer, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 3726.

- [9] C. D. Patz, A. Blicke, R. Ristow, H. Dietrich, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 81.
- [10] M. J. Sáiz-Abajo, J. M. González-Sáiz, C. Pizarro, *Food Chem.* 99 (2006) 615.
- [11] D. Cozzolino, M. J. Kwiatkowski, E. J. Waters, M. Gishen, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2289.
- [12] H. E. Smyth, D. Cozzolino, W. U. Cynkar, R. G. Damberg, M. Sefton, M. Gishen, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1911.
- [13] D. Cozzolino, M. J. Kwiatkowski, R. G. Damberg, W. U. Cynkar, L. J. Janik, G. Skouroumounis, M. Gishen, *Talanta* 74 (2008) 711.
- [14] L. Liu, D. Cozzolino, W. U. Cynkar, R. G. Damberg, L. Janik, B. K. O'Neill, C. B. Colby, M. Gishen, *Food Chem.* 106 (2007) 781.
- [15] D. Cozzolino, R. G. Damberg, L. Janik, W. U. Cynkar, M. Gishen, *J. Near Inf. Spec.* 14 (2006) 279.
- [16] L. Liu, D. Cozzolino, W. U. Cynkar, M. Gishen, C. B. Colby, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6754.
- [17] M. Palma, C. G. Barroso, *Talanta* 58 (2002) 265.
- [18] C. J. Bevin, A. J. Fergusson, W. B. Perry, L. J. Janik, D. Cozzolino, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9713.
- [19] A. Del Signore, *J. Com. Sci.* 39 (2000) 159.

III. Traceability of phytosanitary product in the production of a Sherry wine vinegar.

Phytosanitary products, or most commonly called pesticides, are chemical compounds usually used on agriculture in order to prevent the possible diseases originated by insect plagues, fungi or other pests to crops such as grapes. In the frame of Jerez, the most commonly families of pesticides used belong to the group of organophosphorous compounds, thiocarbamates, phthalimides, benzimidazoles, dicarboximides, triazines and phenylureas, each one used for a different disease [1].

A quantity of pesticide remain deposited on the grape and decrease progressively over time, until the grapes are harvested, when minimal residues can persist till the final product such as wine [2] or wine vinegar. The appearance of these pesticide residues into the final vinegar depends of several factors, as many as steps exist in the production process from the grape to the vinegar, including the intermediate must and wine [3]. Depending of the pesticide and the production process, the evolution will be different. The chemical degradation is the essential way of elimination and logically depends of the chemical stability of the molecule [4]. Sometimes, more toxic degradation products than the original substance are produced such as methyl paraoxon derived from methyl parathion [5]. The reduction of these residues contents can be caused to the adsorption onto the solid matter and subsequent elimination with the marc, to the action of yeasts and enzymes, the addition of clarifiers, acid hydrolysis, or the acetic fermentation, among other processes [6-8]. But even with all these processes, some pesticides can persist till the final vinegar [9].

Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) is a systematic preventive approach that addresses physical, chemical, and biological hazards as a means of prevention rather than finished product inspection. HACCP is used in the food industry to identify potential food safety hazards, so that key actions, known as Critical Control Points (CCP's) can be taken to reduce or eliminate the risk of the hazards being realized. In case vinegar production, the phytosanitary products residues can be considered a CCP, so methodologies for their analysis, vigilance and corrections must be proposed, in order to guarantee the traceability and food safety of vinegars from grapes treated with this kind of products. On the other hand, due to a progressive change in the consumers point of view, the number of products with the "ecologic" or "organic" label is increasing on the market. So, not only those companies "ecologic" vinegar-producing but also those interested in the food safety of their products should monitor the complete vinegar production process.

Stir bar sorptive extraction (SBSE) it has been successfully used in the analysis of pesticides on food samples such as vegetables [10], grapes [11], juices [12], wine [13, 14], and vinegar [9]. On the other hand, the evolution of different pesticides from the processed grapes through the winemaking process to the final wine product has been studied [8, 15-18] but to date, a complete study of vinegar production traceability has never been carried out. In the present chapter, the monitoring of the evolution of the different phytosanitary products employed in the production of a Sherry wine vinegar covering the complete process, from the grape ripening to the vinegar fermentation, has been carried out. For grape samples, the use of two different extraction methods (ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction) was considered. Both

methods were correctly optimized by means of 2^4 factorial designs, and finally were compared between them. After the extraction process, the different extracts were analysed by means of SBSE-GC-MS. For the liquid samples analysis such as musts, wines and vinegars, a method based on SBSE-GC-MS and previously developed was used [9].

After optimizing both methods, five extractions of the same sample were carried out using each one and the results were compared. The obtained results pointed little differences in favour of the ultrasound method. Taking into account, in addition, its higher operational capacity, such as the possibility of doing more extractions at the same time or the possibility of avoiding the heating of the sample, the final selected method for the extraction of pesticides in grapes was the ultrasound assisted method with the following final selected conditions: 10 g of sample with 10 mL of methanol during 10 min and a later centrifugation of 5 min.

After optimizing and validating the grape extraction method, a monitoring of the pesticides during the complete process of production of Sherry wine vinegar has been carried out. The traceability of this product involved the analysis of the grapes during the ripening, the analysis of the subsequent must during the fermentation process, the analysis of the produced wine till it was finally used to produce the vinegar and the analysis during the acetic fermentation process. Four pesticides were found during the traceability of the vinegar: metalaxil, chlorpyrifos, folpet and triadimenol, being those which were used during the ripening process. The evolution of these compounds during the process is shown in figure III.1. Chlorpyrifos, triadimenol and folpet are completely eliminated during the vinegar production process whereas metalaxil remains in the final product, but in a very low concentration, safety for the human consumption.

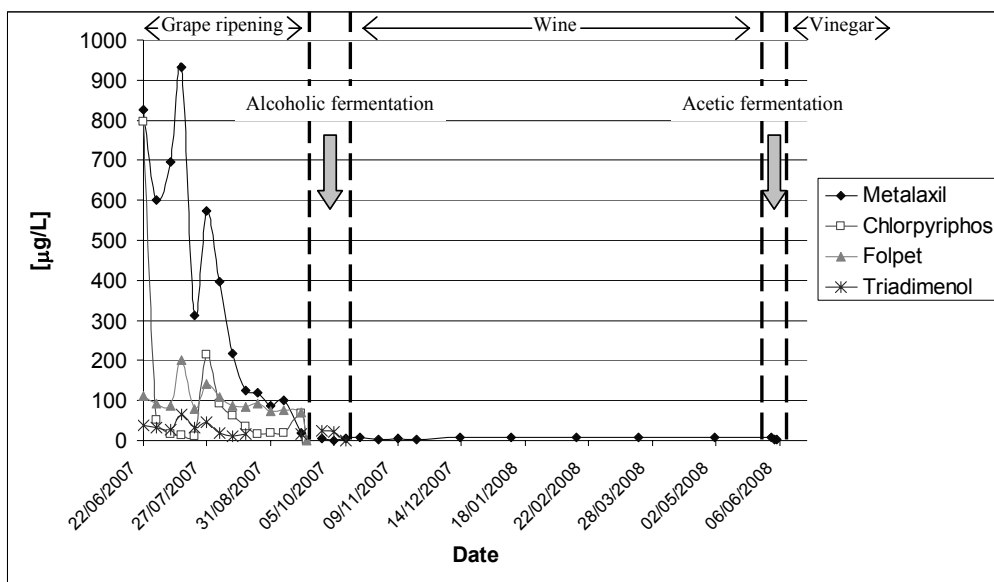


Figure III.1. Evolution of the pesticides during the complete vinegar production process.

REFERENCES

- [1] C. De Liñán, *Vademecum de Productos Fitosanitarios y nutricionales*, Ediciones Agrotécnicas, 2000.
- [2] C. Sala, F. Fort, O. Busto, F. Zamora, L. Arola, J. Guasch, *J. Agric. Food. Chem.* 44 (1996) 3668.
- [3] H. Otteneder, P. Majerus, *Bulletin de l'O.I.V.* (889-890) (2005) 173.
- [4] T. Katagi, *Rev. Environ. Contam. T.* 182 (2004) 1.
- [5] S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, J.-M. Chovelon, *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 33.
- [6] P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, F. M. Pirisi, G. A. Farris, G. Madau, G. Emonti, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3854.
- [7] T. Nagayama, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 38(4) (1997) 270.
- [8] P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, M. Melis, F. M. Pirisi, E. V. Minelli, F. Cabitza, M. J. Cubeddu, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 2708.
- [9] E. Durán, R. Castro, R. Natera, C. G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 144.
- [10] P. Sandra, B. Tienpont, F. David, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 299.
- [11] A. Juan-García, J. Mañes, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 119.
- [12] V. G. Zuin, M. Schellin, L. Montero, J. H. Yariwake, F. Augusto, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 180.
- [13] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G. A. Baldock, R. L. Taylor, A. P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [14] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 117.
- [15] P. Cabras, A. Angioni, V. L. Garau, M. Melis, F. M. Pirisi, J. Espinoza, A. Mendoza, F. Cabitza, M. Pala, V. Brandolini, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3249.
- [16] S. Navarro, A. Barba, J. Oliva, G. Navarro, F. Pardo, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 264.
- [17] S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, N. Vela, J. Oliva, *J. Chromatogr. A* 882, (2000) 221.
- [18] S. Navarro, J. Oliva, G. Navarro, A. Barba, *Am. J. Enol. Vitic.* 52(1) (2001) 35.

IV. GC-MS characterization of volatile compounds in quality vinegars with protected European geographical indication

In the European Union, the promotion of foods which have been recognized to be traditionally linked to a certain geographical area is based upon a legislative system known as “protected denomination” [1] Nowadays, most of the member states possess a number of food specialties with a Protected Designation of Origin (PDO), or a Protected Geographical Indication (PGI), each of them obtained following approved specifications related to their chemical-sensory features, their production process and certification.

For what concern vinegars, two different PDO exist that are: i) Traditional Balsamic Vinegar of Modena (TBVM) and ii) Traditional Balsamic Vinegar of Reggio Emilia (TBVRE). Two further specialties are the Sherry vinegar, a produce which has its own denomination of Origin and has recently been submitted to the European Commission for inclusion as PDO [2], and Balsamic Vinegar of Modena, that is under consideration of European Commission and its Geographical Indication is now temporarily protected.

TBVM and TBVRE are Italian vinegars coming from the Emilia-Romagna region, differing almost exclusively for the production area and the grape cultivars used to obtain the starting must. They consist of a dark, syrupy sausage in which the sour notes (characteristic of conventional wine vinegars) are well balanced by a sweet background deriving from the initial unfermented must. Briefly, for TBVM, the process starts with the cooking of the grape must in open boilers to reduce the initial volume of about 30%. During this phase, conditions are propitious for the development of caramelization and Maillard reactions [3, 4] that generate compounds some of which with a remarkable aromatic impact. Once cooked, the must is transferred to a cask where a partial alcoholic fermentation takes place (up to 70 g/L). After 5 or 6 months, the acetification process is promoted and the product is divided in some smaller casks (typically 5) made of different kind of wood (oak, chestnut, mulberry, juniper) and of decreasing volume. A long ageing period follows during which, due to evaporation, casks are refilled using the “solera” method (Figure IV.1). Only after 12 years of ageing, the vinegar could be withdrawn to be marketed as TBVM while for the older “Stravecchio” vinegar, the ageing should be at least 25 years.

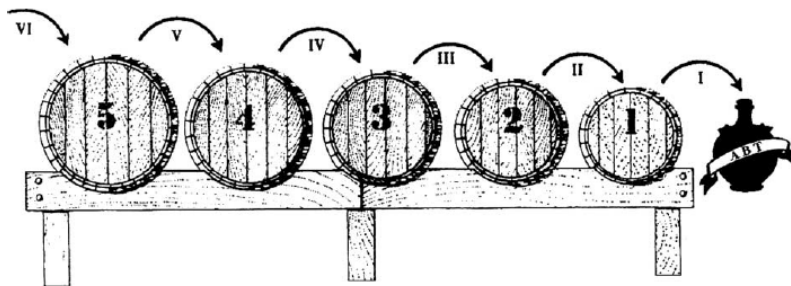


Figure IV.1. A typical set of barrels for “Aceto Balsamico tradizionale” (ABT) production. Arabic numerals identify each cask, while Roman numerals indicate the sequence of the drawing procedure. [5]

Balsamic vinegar of Modena differs from the above cited TBVM in the fact that it substantially comes from a wine vinegar to which a minor portion of cooked must and caramel have been added and that undergone to a shorter ageing period (from 6 months to 2 years) usually in one single oak cask.

Finally, Sherry vinegar is a Spanish D.O. produced in the Sherry wine region (Andalucia) and derives from a wine vinegar aged in casks often following the traditional “solera” method for at least 6 months (Vinagre de Jerez) or 2 years (Reserva). Very recently, a further category of VJ, aged at least 10 years (Gran reserva) has been introduced.

Apart from the different raw material (the grape) and the geographical area, all these vinegars share some production similarities and, at the same time, differ for specific technological phases that overall could contribute to their aromatic complexity and diversity. For instance, all of them undergone to an acetic fermentation and to a wood ageing (even if, in some cases, of different duration). On the other hand, only BVM and VJ comes from an alcoholic raw material (the wine), while TBVM is produced from partially fermented musts. Moreover, caramelization and Maillard reactions occur only in the TBVM production process (during the cooking of the must) while the “Solera” method is characteristic of both TBVM and VJ. The volatile composition of these vinegars has been the subject of previous independent studies [6-10], most of them carried out by means of the GC-MS technique. However, due to differences in sampling, sample extraction and analytical procedures, data are difficult to compare and a comprehensive assessment of their composition in volatile compounds is still lacking.

The aim of this work was, hence, the characterization of the volatile composition of TBVM, BVM and VJ by means of a previously developed and validated SPE extraction method applied to GC-MS analysis [11].

A total amount of 93 compounds grouped into different chemical families (alcohols, aldehydes, acids, acetates, enolic derivatives, esters, furanic and pyranic derivatives, ketones, lactones, phenols and terpenes) have been identified and subsequently quantified in different samples of TBVM, BVM, and VJ.

We can underline that several compounds have been identified in VJ for the first time such as ciclotene, maltol, 5-hydroxymaltol and DDMP (2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one). On the other hand, significant differences in the relation of *cis* and *trans*-whiskeylactone have been found in TBVM and VJ. This can be explained in order of the use of different type of wood in the aging of these two vinegars.

Using all collected data, a PCA showed in figure IV.2 has been carried out. As can be seen, vinegar samples with different origin can be correctly differentiated by means of their aromatic profile.

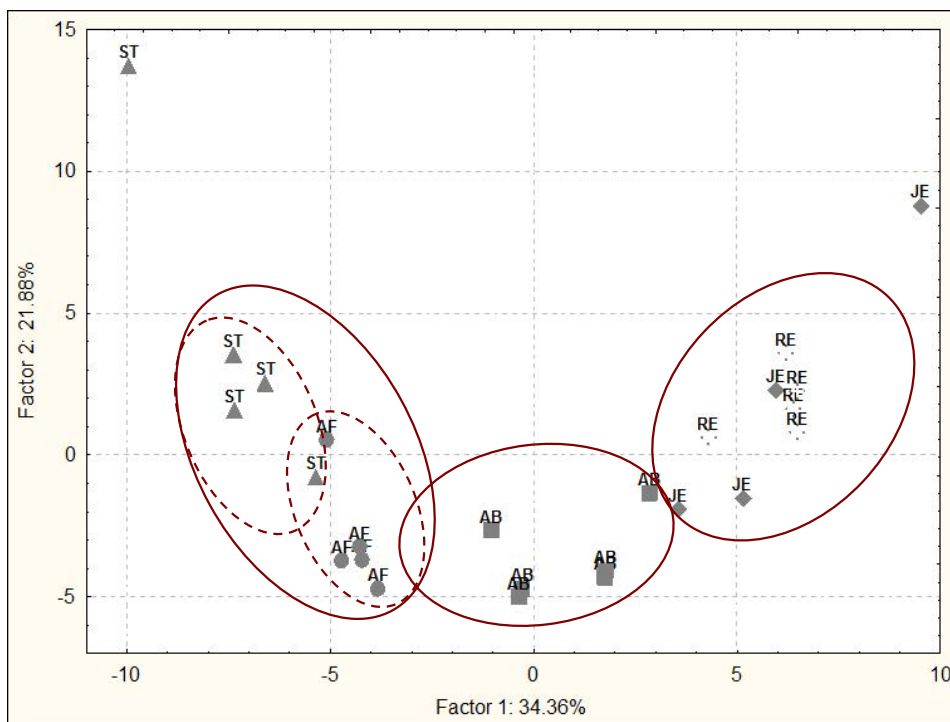


Figure IV.2. PCA score plot based on aromatic profile of the vinegar samples. ST: “stravecchio” traditional balsamic vinegar of Modena; AF: “affinato” traditional balsamic vinegar of Modena; AB: balsamic vinegar of Modena; JE: vinegar of Jerez; RE: vinegar of Jerez “reserva”.

REFERENCES

- [1] http://ec.europa.eu/agriculture/foodqual/quali1_en.htm
- [2] Spanish Legislation, BOE n° 100, 25 of April, 2008.
- [3] F. Gogus, H. Bozkurt, S. Eren, *Lebensm. Wiss. Technol.* 31 (1998) 196.
- [4] A. Piva, C. Di Mattia, L. Neri, G. Dimitri, M. Chiarini, G. Sacchetti, *Food Chem.* 106 (2007) 1057.
- [5] F. Masino, F. Chinnici, G. C. Franchini, A. Ulrici, A. Antonelli, *Food Chem.* 92 (2005) 673.
- [6] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C. G. Barroso. *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 47.
- [7] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C. G. Barroso. *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 18.
- [8] R. M. Callejón, A. G. González, A. M. Troncoso, M. L. Morales, *J. Chromatogr. A* 1204 (2008) 93.
- [9] M. Ugliano, E. Squillante, A. Genovese, L. Moio, *Proceedings of the Weurman Flavor Research Symposium*, (2002) 773.
- [10] A. Del Signore, *J. Food Eng.* 50 (2001) 77.
- [11] E. Durán Guerrero, F. Chinnici, N. Natali, R. Natera, C. Riponi, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3030.

V. Accelerated aging studies with microoxygenation and chips in the production of a Sherry wine vinegar

Conventional Sherry wine vinegar aging process resorts to the using of oak wood barrels in which the vinegar is introduced to be aged. In these barrels, the vinegar is in close contact with the wood, which porosity provides to the medium a contribution of oxygen that conditions its evolution during the aging.

In this work, an aging method which managed to accelerate the process as well as to obtain a vinegar with similar analytical and organoleptic characteristics to the traditional vinegar has been developed. To achieve the optimal conditions, several experiments using “suitable” wine vinegar for the production of Sherry vinegar, have been carried out. In these experiments, the addition of chips together with the use of microoxygenation was used, modifying both the amounts of chips and the volumes of flow of oxygen.

The experiments were carried out in a local vinegar production company, using tanks with 5000 litres of capacity and heights upper of two metres, in order to guarantee the complete oxygen dissolution process. During the development of the different experiments, samples of the tanks were periodically taken, in order to determine the polyphenolic composition, volatile composition, medium-FT-IR spectra and colour analysis.

Moreover, sensorial analyses of all the samples were carried out by means of a trained panel. Figure V.1 shows the radial chart where some of the different experiments carried out, are compared: control (C), traditional aging (B), different amounts of oxygen with chips (O1, O2, O3), and only chips (Os).

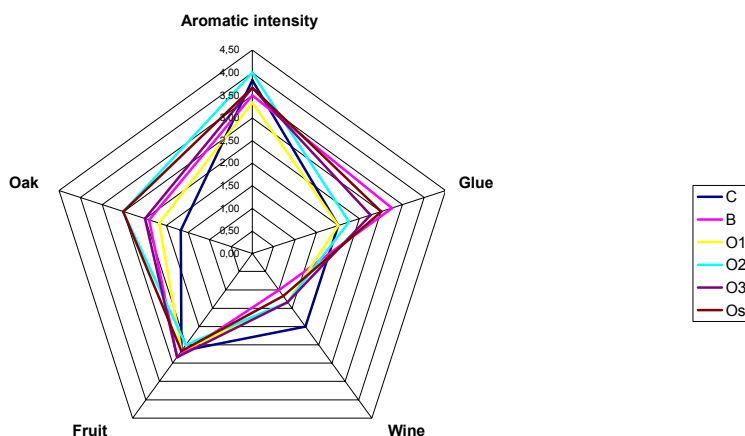


Figure V.1. Radial chart of the sensorial analysis related to different experiments.

After evaluating the analytical and organoleptic data, the final experimental conditions were fixed. These final conditions could be substitutes of the conventional aging method thanks to the production of vinegar with similar organoleptic characteristics but obtained in a minor time.

CONCLUSIONS

Taking into account the obtained results, the following conclusions can be enumerated:

- 1) Stir bar sorptive extraction (SBSE) was evaluated for analysing volatile compounds in vinegar. The extraction and desorption analytical conditions have been optimised using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. For the extraction step, the optimum analytical conditions were: sample volume 25 mL without dilution, sampling time 120 minutes, NaCl content 5.85 g, and stirring speed 1250 rpm. For the desorption step, the optimised analytical conditions were: desorption temperature 300°C, cryofocusing temperature -140 °C, flow of helium 75 ml min⁻¹, and desorption time 10 min.
- 2) Stir bar sorptive extraction was evaluated for analysing volatiles in vinegar. The procedure developed shows detection and quantitation limits, and linear ranges adequate for analysing this type of compounds. The accuracy obtained were close to 100%, with repeatability values lower than 13%. Acetic acid competes in the extraction, but for quantitative analysis, the internal standard may be used. This is a very simple and solventless technique that is in good agreement with SPME technique and, in general, exhibits better sensitivity and reproducibility values.
- 3) The conditions for the analysis of pesticide residues in vinegars using SBSE-TD-GC-MS have been optimized by means of a statistical approach. After optimization, the proposed analytical conditions are: sample volume 40 mL, sampling time 150 minutes, and stirring speed 1000 rpm. Under the optimized conditions used in this study, SBSE can be considered an appropriate technique for the analysis of this type of compounds in vinegars. The detection and quantitation limits, and the recoveries obtained are adequate for the quantification of these compounds in vinegars, and especially for monitoring ecological products in which the use of pesticides is not permitted.
- 4) The conditions for the analysis of volatile compounds in traditional balsamic vinegars (TBV) using SPE-GC-MS have been optimized by means of a statistical approach. LiChrolut-EN SPE cartridges were used and the optimized analytical conditions were: 7 g of TBV diluted 1:4, 5 mL of washing water and elution with 10 mL of dichloromethane. Under the optimized conditions used in this study, SPE can be considered an appropriate technique for the extraction of this type of compounds from matrixes with the level of complexity of TBV. The detection and quantitation limits, and the accuracy obtained are adequate for the quantification of the studied compounds. In view of the obtained results, the developed method can be used for further researches related to the volatile composition of TBV, increasing the number of studied compounds.
- 5) FT-IR calibrations have been made to determine the aromatic compounds present in vinegars during the acetic fermentation process. A change in the concentration of the majority species takes place in this process. To perform these FT-IR calibrations, specific zones of the IR spectrum have been employed,

which have permitted the calibrations to be validated, with error prediction values below 10% for ethyl esters and higher alcohols, and with errors below 20% for fatty acids. For the case of derivatives of acetic acid and furfurals, the prediction errors in the validation of the method were between 20 and 30%. With these results, FT-IR is put forward as a valid technique for monitoring the acetic fermentation process, and for controlling it on-line, on the basis of the production and variation of components related to the quality of the vinegar.

- 6) Mid-IR spectroscopy is able to classify vinegar samples from different raw materials and process of production (with and without aging in wood). The correct classification percentages obtained were similar to those obtained using several analytical parameters. This fact in sum to several advantages of this technique (rapidity, non-destructive, low cost, no sample preparation, no qualified laboratory personnel, etc.) turns it into a promising tool in order to the classification of vinegars from different raw materials and process of production with a similar degree of reliability to those obtained using several analytical parameters which are characterised by involving a high cost and time consuming. However we must be cautious and take into account that the conclusions of this study are limited by the relatively small number of samples. In order to totally validate the ability of mid-IR to classify vinegar samples a bigger sample set will be necessary.
- 7) It is important to have reliable and sensitive methods which allow determining the concentration of the residues of phytosanitary products, due to the high persistence of some of them. This is indispensable when dealing with products labelled as “ecologic”, where the use of this kind of phytosanitary products is completely forbidden by the corresponding legislation. A method of ultrasound assisted extraction of pesticides in grapes prior to SBSE-GC-MS analysis has been developed. It has been applied to study the traceability of the phytosanitary products employed during the production of Sherry wine vinegar. Chlorpyrifos, triadimenol and folpet are completely eliminated during the vinegar production process whereas metalaxil remains in the final product, but in a very low concentration, safety for the human consumption.
- 8) The characterization of the volatile composition of traditional balsamic vinegars, balsamic vinegars and Sherry wine vinegars has been carried out by means of an SPE extraction method applied to GC-MS analysis. A total of 93 compounds have been identified and quantified in the vinegar samples. Using this exhaustive study of the aromatic profile, the differentiation of the different types of vinegars has been successfully carried out.
- 9) An aging method based on the addition of chips together with the use of microoxygenation, which managed to accelerate the process as well as to obtain a vinegar with similar analytical and organoleptic characteristics to the traditional vinegar has been developed. The polyphenolic composition, volatile composition, medium-FT-IR spectra and colour analysis were determined. Moreover, sensorial analyses of all the samples were carried out by means of a trained panel. After evaluating the analytical and organoleptic data, the final experimental conditions were fixed. These final conditions could be substitutes

English summary

of the conventional aging method thanks to the production of vinegar with similar organoleptic characteristics but obtained in a minor time.

ARTÍCULOS DERIVADOS

DE LA TESIS



Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products

Remedios Castro · Ramón Natera · Enrique Durán · Carmelo García-Barroso

Received: 31 March 2008 / Accepted: 25 May 2008 / Published online: 12 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract Aroma compounds are most closely associated with the volatile fraction of foods. Common analytical separation procedures employed to analyse volatile compounds need, even today, that prior to GC analysis of an aroma or a fragrance, these compounds be concentrated or/and isolated from the non-volatile matrix. This step constitutes a problem that has still not been satisfactorily resolved and for this, several sample preparation methods can be found into the bibliography. This review gives a brief overview of solid phase extraction techniques to analyse volatiles. Procedures such as solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE), and the recent solid phase dynamic extraction (SPDE) will be discussed and critically evaluated. Contemporary applications of these techniques to the study of volatile compounds in wine and other enological products will be presented.

Keywords Volatile compounds · Enological products · SPE · SPME · SBSE · SPDE

Introduction

The study of the volatile fraction in enological products has become necessary and is more than sufficiently justified, considering these compounds make a major contribution to the consumer's overall perception of the quality of particular food and drink products. In fact, these complex volatile com-

pounds largely determine the acceptance or rejection of many products by the consumer. In addition, product characteristics known as “off-flavours”, caused by the presence of volatiles that give rise to disagreeable odours and flavours, often imply microbial contamination; therefore the study of volatiles becomes part of the larger subject of food safety.

It must also be borne in mind that the volatile fraction of these food and drink products tends to be conditioned by all the different circumstances of their production, and as a result the characterisation and differentiation of these products may be possible on the basis of the volatile fraction. There is ample evidence in numerous studies that it is possible to establish clear relationships between the following aspects: the raw material employed, the place where that material originated, the process of production followed, etc. and the volatile fraction of the product [1–6].

The determination of the volatile fraction is normally performed by gas chromatography (GC), a technique which in recent years has made great advances. Nevertheless, it should be recognized that, despite this, in the majority of the cases, determination by GC needs to be preceded by a prior stage of sample preparation. The need for sample preparation is imposed by various factors, most notably the following:

- The low concentrations in which the analytes of interest are present.
- The great chemical variety that these present: acids, alcohols, esters, ketones and many other types of compound that could be found.
- The fact that in the majority of cases these compounds are found in matrices of great complexity, as is the case of enological products.
- And last, the low chemical stability of the compounds, together with the limited specificity of the systems of detection.

R. Castro (✉) · R. Natera · E. Durán · C. García-Barroso
Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences,
University of Cádiz, Pol. Río San Pedro, s/n, P.O. Box 40,
11510 Puerto Real, Cádiz, Spain
e-mail: remedios.castro@uca.es

All of these considerations lead us to seek techniques that allow their fractionation and concentration prior to the analysis by CG, making sample preparation a critical step when characterising the volatile fraction of these products.

If we first consider how to classify the various different techniques used for sample preparation prior to GC analysis, we find a number of different classifications in use. One of the criteria adopted when dealing with this classification is the physico-chemical property on which the isolation of these analytes is based [7]. Thus we find that there are techniques based on the following:

- The volatility of the analytes: distillation processes and head space techniques.
- Solubility of the analyte in certain organic solvents: soxhlet extraction, liquid-liquid extraction (LLE), supercritical fluid extraction (SFE), solid phase extraction (SPE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and microwave-assisted extraction (MAE).
- The adsorption and absorption of the analyte on a particular material: solid phase extraction (SPE), solid phase microextraction (SPME), stir-bar sorptive extraction (SBSE) and solid phase dynamic extraction (SPDE).
- And the last group where we find those techniques that make use of both properties: the most notable of these is simultaneous extraction-distillation, together with other instrumental configurations where several of the previously mentioned techniques are combined.

In this review we shall consider the application to enological analysis of some of the techniques included in the second group that share the common feature of being based on the employment of adsorptive and/or sorptive materials in order to trap the analytes of interest. SPE is still employed to analyse volatile compounds, although it has now been largely replaced by methodologies that are less aggressive and more sensitive, such as SPME, SBSE and the contemporary SPDE.

SPE

SPE can be directly applied to isolate and concentrate volatile compounds from liquid samples. This technique, introduced in the eighties, is based on the selective retention of some analytes and their subsequent elution by an appropriate solvent.

Depending on the type of sorbent and on the characteristics of the analyte, a series of physical and chemical interactions are established that allow the analyte of interest to be separated from the rest of the components of the sample. The selectivity of the separation will be conditioned by the type of sorbent and eluent employed.

The sorbents utilized are similar to the stationary phases employed in liquid chromatography, and can be grouped

into polar, non-polar and ion exchange types. The choice of the sorbent depends on the nature of the analyte, of the matrix, and of the possible interferents. Of particular importance are the silica and polymeric sorbents, such as styrene-divinylbenzene copolymers. The silica sorbents are characterized by presenting a low loading capacity and a high consumption of solvents and time; in addition, in some cases, we can be faced with irreversible sorption and with the degradation of certain analytes [8]. The second type, based on styrene-divinylbenzene polymers, are characterized by presenting a greater loading capacity, more stability against extreme pH values, plus the capacity for employment in both reversed and normal mode [8].

SPE is a technique that has great applicability to enology, having in some cases displaced liquid-liquid extraction.

Application of SPE to enological products

Wada and Shibamoto [9] studied the extraction of odorant from red wines using Porapak Q columns (ethylvinylbenzene-divinylbenzene copolymer). Different solvents were tested, and dichloromethane was found to be the best, with recoveries near to 100%.

Different authors have employed styrene-divinylbenzene copolymers in order to study the volatile fraction of some enological products [8, 10–12]. López and others [10] used LiChrolut-EN (styrene-divinylbenzene copolymer) for the extraction of 27 volatiles from wine. Wine measuring 50 mL was extracted using 200 mg of resin. The authors concluded that the SPE analytical methodology was satisfactory for the study of wine aroma.

Later, Culleré and others [8] using the same type of sorbent carried out the fractionation of wine flavour. First, volatile compounds were isolated and concentrated with dichloromethane and then they were fractionated using a second LiChrolut-EN cartridge. A first fraction, rich in ethyl esters and some other non-polar compounds, was eluted from this second cartridge with pentane. The second fraction, which concentrates the alcohols and some volatile phenols, was eluted with pentane dichloromethane (9:1), while the third fraction, eluted with dichloromethane, is rich in fatty acids, vanillin derivatives and lactones.

Genovese et al. [12] used three extraction methods for the determination of the aroma composition of red wines: separation of the alcoholic fraction from the aqueous phase by salting out and liquid-liquid extraction with trichlorotrifluoroethane; liquid-liquid extraction with dichloromethane; and solid-phase extraction using 800 mg of LiChrolut EN resin with pentane-dichloromethane (20:1) and dichloromethane. These authors concluded that, owing to the variety of the chemical species that constitute the aroma of red wines, only the combination of different extraction techniques can allow their complete evaluation.

Several studies can be found into the bibliography about silica sorbents and volatile compounds of enological products [13–15]. Lukic and others investigated the adsorption properties of octadecylsilica sorbent for the determination of some varietal and fermentation aroma compounds in grape distillates [13]. In this case, a 3-mL volume of sample was diluted to 25 mL and dichloromethane was selected as eluent. The SPE method was validated and the possible matrix effect of acetic acid and ethanol content was evaluated. In general, good recoveries were obtained, except for some alcohols such as 2-phenylethanol, *cis*-2-hexen-1-ol and *cis*-3-hexen-1-ol. These authors concluded that the influence of the non-polar alkyl chain in the straight-chain alcohol or acid molecule prevails over the hydrophilic hydroxyl or carboxylic functional group and is responsible for high SPE recoveries. This is in agreement with Ferreira and others [14], who found that silica-based sorbents were suitable for the extraction of analytes that show a Bronsted–Lowry acid character.

Among the volatile compounds that are responsible for the floral character of wines, some monoterpenes can be found. Their concentrations in grapes and wines are influenced by several factors such as grape variety, climate, viticultural and enological practices, etc. Obtaining a ‘terpene profile’ is extremely useful for differentiating the genuinely monovarietal wines from those made by a mixture of several other varieties. Therefore, the determination of the above-mentioned profiles is a valuable tool for detection of fraud.

A first study using a C18 cartridge to determine the content of terpenes (free and glycosidically linked) in wines from the white cultivar Muscat Lefko from the Greek island of Samos was carried out by Karagiannis and others [16]. Extraction of free and mono and dihydroxylated terpenes was performed with dichloromethane, whereas extraction of trihydroxylated and glycosidically linked terpenes was performed with methanol.

Later, Piñeiro and others [17] compared different C-18 cartridges to others with a styrene-divinylbenzene solid phase for the determination of monoterpene derivatives in wines. The best results were obtained for two styrene-divinylbenzene cartridges, LiChrolut EN and Strata SDB-L, using dichloromethane as eluent.

Lactones are a group of compounds that make an important contribution to the aroma in wines [18]. Ferreira and others have developed a SPE method for the selective extraction of aliphatic lactones in wines [19]. For this, 200 mg Bond Elut-ENV resins are conditioned by rinsing with 2 mL of methanol and 4 mL of water. After this, 50 mL of wine is passed through the cartridge. The interferences are removed with a mixture of methanol–water 40:60 (v/v) enriched with 1% (w/v) NaHCO₃. Lactones are eluted with 1.8 mL of dichloromethane. Later, this volume is concen-

trated to 0.15 mL in a bath at 47 °C. Following this methodology, it was proved possible to quantify eight C8–C12 aliphatic lactones in wines, with recoveries higher than 75% and excellent precision (average RSD 3.5%) and linearity ($r^2 \geq 0.996$).

Recently, Campo and others [20] have employed a SPE methodology to the determination of four powerful aroma compounds (2-, 3- and 4-methylpentanoate and ethyl cyclohexanoate) in wine, whisky and brandy. 100 mL of sample is extracted using a LiChrolut EN bed. A water–methanol solution is employed to eliminate the major compounds and dichloromethane is used as elution solvent.

On the other hand, cork taint is one of the most significant organoleptic defects in wines. Cork is the traditional material used to produce stoppers for wine bottling. Cork stoppers are obtained from the bark of cork oak (*Quercus suber*), which grows mainly in Mediterranean countries. Cork is a natural product and is not inert, so it can interact with wine, sometimes modifying its flavour and can even cause organoleptic defects. This is the case of the musty/mouldy taint, traditionally known as cork taint. Some of the compounds involved in this defect may originate in the cork stopper. The mainly responsible compound is 2,4,6-trichloroanisole (TCA), but also, to a lesser extent 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA) and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole (PCA) are also responsible. Chloroanisoles usually arise from *O*-methylation of chlorophenols, as a detoxification method, by various microorganisms, especially fungi, under particular conditions of temperature and humidity. Chlorophenols are often present because of the packaging, the fungicides, herbicides or wood preservatives that are used in wineries, or the practices of some cork stopper manufacturers, such as using hypochlorite as a cork bleaching agent. The wines could also become contaminated in the cellar. For instance, chlorophenol contamination is possible in the pallet crates used for bottle storage. These chlorophenols may develop into chloroanisoles, which could contaminate the cellar atmosphere and, consequently, contaminate the wine during the winery operations. The presence of chloroanisoles in wine is due to their ability to migrate from cork to wine if they are present in contaminated cork. Taking into account the bad odour (off-flavours) and low sensorial perception threshold of these compounds, between 1 ng/L and 50 ng/L, this migration will imply serious consequences for the organoleptic properties of affected wine, undermining its quality.

The determination of chloroanisoles in wines, therefore, has stimulated extensive research over the last decade to develop methods as sensitive as the human sensory threshold. To avoid the financial losses caused by this musty off-flavour, it is very important to prevent this defect by the effective control of chloroanisoles in cork. This control requires appropriate analytical methods which must pro-

vide enough sensitivity and selectivity as well as good repeatability and recovery. Gas chromatography is the most common technique used in these studies, usually coupled to either a mass spectrometer detector, or to an electron capture detector (ECD) and, recently, coupled to an atomic emission detector. However, due to low chloroanisole contents in cork, a prior extraction and concentration step is necessary, and several different techniques have been employed to this end. Insa and others developed a solid-phase extraction method for the determination of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and 2,4,6-tribromoanisole (TBA), which seem to be the compounds that contribute most to this problem [21]. In this method, 50 mL of wine was extracted with 50 mg of LiChrolut EN resins, using 0.6 ml of dichloromethane as eluent. A 40- μ L aliquot of this extract was injected into the GC system using a programmed temperature vaporizing injector (PTV) as large volume injection technique. The SPE method was validated, obtaining RSD values lower than 6% and recoveries higher than 80%. The detection limits were 0.2 and 0.4 ng/L for TCA and TBA, respectively. These values are below the odour detection threshold of these compounds.

Another volatile compound reported in several products such as wines, and which is characterized by a fungus odour, is 1-octen-3-one. Its determination in wines has been recently optimized by Culleré and others [22]. The analyte is selectively preconcentrated in a 90-mg LiChrolut-EN solid phase extraction cartridge and, after this, is derivatized with O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine (PFBHA) in the same cartridge. The elution of the oximes of the analyte is carried out with 2 mL of pentane. After the optimization of the SPE method, the authors evaluated linearity, limits of detection and accuracy. Good linearity was obtained up to 900 ng/L, with a squared correlation coefficient of 0.9990. The precision obtained was satisfactory and the method is free from matrix effect.

Among volatile compounds that negatively affect the aroma of wine are volatile phenols such as ethylphenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiaicol) and vinylphenols (4-vinylphenol and 4-vinylguaiaicol). These compounds are considered part of the aroma composition of wines and can produce unpleasant odours, affecting negatively the quality of the wine. Dominguez and others [23] developed a SPE method to determine volatile phenols in fino sherry wine, a typical white wine from the Jerez–Xérès–Sherry Denomination of origin region [24]. Briefly, the cartridges employed were Lichrolut EN (200 mg), conditioned with 5 ml of methanol and 3 ml of water. A total of 10 ml of wine was used. The cartridges were rinsed with 0.6 ml of water and dried with helium. Finally, 2.5 ml of dichloromethane was applied as eluent. The SPE methodology optimized by these authors was compared to two other methods based on liquid-liquid extraction. The SPE method showed

a higher selectivity and sensitivity for these compounds than the others. Further, practical advantages in respect of sample volume, time, and number of samples extracted in a single extraction session, lead the authors to select the SPE methodology for the determination of volatile phenols in fino sherry wine.

Vinegar is used not only as a condiment but also as ingredient in many food products, particularly sauces and dressings. Due to the diversity of vinegars available in the market and the increase in demand, it has been considered necessary to investigate reliable analytical methods to establish criteria for determining quality and origin. In vinegars, Charles and others [25], after neutralization with NaOH, studied the representativeness of four extracts obtained by liquid-liquid extraction with dichloromethane and SPE using XAD-2, a mixture of XAD-2 and XAD-7, and Extrelut resins. Panelists indicated that the liquid-liquid extract was the most representative of the volatile fraction of vinegar.

Later, Morales and others compared two SPE methods to a liquid–liquid extraction method with dichloromethane for the analysis of volatile compounds in vinegars [26]. For the SPE, two cartridges were tested: a LiChrolut EN and a Bond Elut ENV. Dichloromethane was used as eluent in both cases. Liquid-liquid extraction showed a higher extraction than the SPE methods only for furfuryl alcohol. In the case of SPE methods, Bond Elut ENV cartridges gave low responses for furanic compounds, so the authors selected LiChrolut EN cartridges for the extraction of volatile compounds of vinegars.

Table 1 includes various different applications of SPE to wine and other enological products.

SPME

Solid phase microextraction (SPME) is an extraction technique developed by Pawliszyn [27–29] at the beginning of the 1990's.

It is based on the establishment of a partition equilibrium of the analytes between a polymeric stationary phase, which covers a fused silica fibre, and the matrix of the sample, Fig. 1. This technique does not require the employment of organic solvents, thus eliminating all the disadvantages that this entails. It is a simple, rapid and inexpensive technique in which the extraction and concentration processes are performed simultaneously, Fig. 2. Further, only small volumes of sample are required. The device can be coupled easily to a gas chromatography system and, with some modifications, to a high performance liquid chromatography (HPLC) system.

The SPME device consists of a small fibre of fused silica (usually of 1 cm length and 0.11 mm internal diameter),

Table 1 SPE analytical conditions used to analyse volatile compounds in enological products

Authors	Matrix	Column	Analytes	Extraction conditions
Wada and Shibamoto [9]	Red wine	Ethylvinylbenzene-divinylbenzene copolymer	Flavour	<i>Solvent:</i> dichloromethane
López et al. [10]	Wine	Styrene-divinylbenzene copolymer	Flavour	<i>Sample volume:</i> 50 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Culleré and others [8]	Wine	Styrene-divinylbenzene copolymer	Flavour	<i>Sample volume:</i> 75 mL; <i>Solvents:</i> dichloromethane, pentane and pentane:dichloromethane (9:1)
Lukit et al. [13]	Grape distillate	Octadecylsilica	Flavour	<i>Sample volume:</i> 3 mL diluted to 25 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Dieguez et al. [15]	Spirits	Silica	Volatile organic acids	<i>Sample volume:</i> 50 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Genovese et al. [12]	Red wine	Ethylvinylbenzene-divinylbenzene copolymer	Flavour	<i>Sample volume:</i> 50 mL; <i>Solvents:</i> pentane:dichloromethane (20:1) and dichloromethane
Karagiannis et al. [16]	White wine	Silica	Terpenes	<i>Sample volume:</i> 25 mL; <i>Solvents:</i> dichloromethane and methanol
Piñeiro et al. [17]	White wine	Styrene-divinylbenzene copolymer	Terpenes	<i>Solvent:</i> dichloromethane
Ferreira et al. [19]	Wine	Styrene-divinylbenzene copolymer	Aliphatic lactones	<i>Sample volume:</i> 50 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Campo et al. [20]	Wine, whisky and brandy	Styrene-divinylbenzene copolymer	Flavour	<i>Sample volume:</i> 100 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Insa et al. [21]	Wine	Styrene-divinylbenzene copolymer	Anisoles	<i>Sample volume:</i> 50 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Dominguez et al. [23]	White wine	Styrene-divinylbenzene copolymer	Volatile phenols	<i>Sample volume:</i> 10 mL; <i>Solvent:</i> dichloromethane
Charles et al. [25]	Vinegar	Styrene-divinylbenzene copolymer	Flavour	–
Morales et al. [26]	Vinegar	Styrene-divinylbenzene copolymer	Flavour	<i>Solvent:</i> dichloromethane

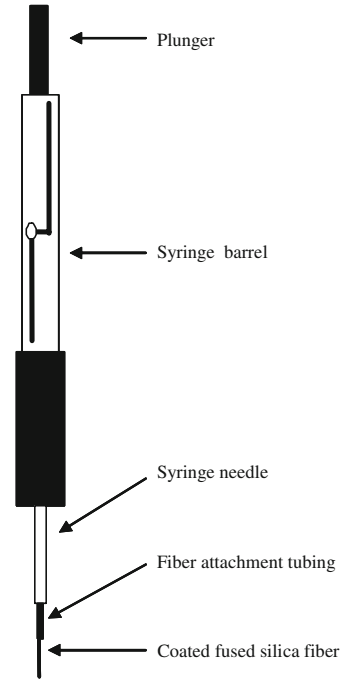


Fig. 1 Diagram of an SPME device

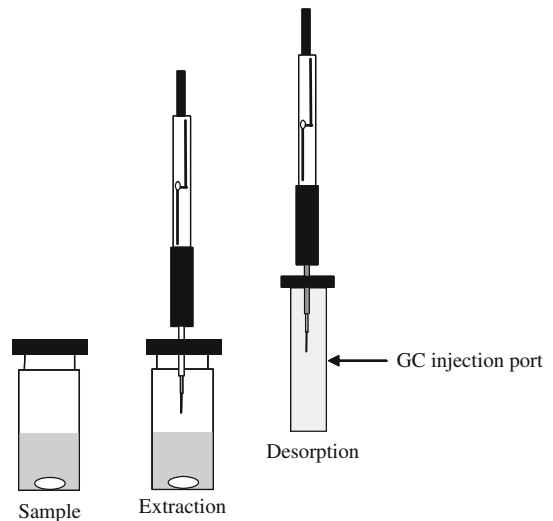


Fig. 2 Stages of the solid phase microextraction process

normally coated with a polymeric phase. For protection, this fibre is mounted in a type of modified syringe or holder, Fig. 1. The analytes are retained by the fibre until the system reaches equilibrium.

Solid phase microextraction comprises two stages: extraction and desorption [7]. In the first stage, the sample

is placed in a vial. The vial is sealed with a septum and a capsule. The needle of the syringe with the fibre inside it perforates the septum. Then, by actuating the plunger, the fibre is brought into contact with the aqueous sample or with the headspace that exists over the liquid. After a pre-determined time, the fibre is withdrawn and inserted back into the needle and the syringe is withdrawn from the sampling vial. In the stage of desorption, immediately following, the syringe is inserted in the injector of an analytical instrument (GC or HPLC), where the analytes are desorbed thermally or by solution in the mobile phase, according to the instrumental technique employed. This desorption stage takes 1–2 min to complete. In HPLC the standard injector must be replaced by a special device.

There are three basic types of solid phase microextraction: direct extraction, headspace extraction, and extraction utilising a protective membrane. The thermodynamics predict the effects produced by certain extraction conditions on the distribution of the analytes between the fibre and the matrix. These parameters are as follows: the polymeric coating of the fibre, extraction temperature and time, saline effect, pH of the sample, volume of the sample, volume of the head space, agitation of the sample, and shape of the vial. The chemical nature of the analyte determines what type of phase must be utilised in the extraction. Currently, various types of stationary phase are commercially available, with different thicknesses and polarities that show affinity for different analytes. In Fig. 3 the characteristics of some of the more frequently utilized phases are indicated [29]. Polydimethylsiloxane (PDMS) is a non-polar phase that presents great affinity for apolar compounds, although it can be utilized to extract moderately polar compounds. Polyacrylate (PA) is a phase that is suitable for more polar compounds. In addition to these two general types of phase,

other coatings of more specific materials, and mixed phases that have properties complementary to those of the PDMS and PA phases, have been developed. In this group are included the polydimethylsiloxane/polydivinylbenzene (PDMS/DVB) phases; polyethyleneglycol/polydivinylbenzene (Carbowax/DVB), and Carboxen/PDMS. These fibres, more polar than those of PA, are suitable for extracting more polar compounds like alcohols and ethers. In addition, fibres of Carboxen/PDMS have a larger surface area and are suitable for the extraction of volatile organic compounds (VOCs).

Solid phase microextraction (SPME) is now being utilized satisfactorily, in combination with gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry (GC-MS), and is being applied to a great variety of compounds in the analysis of wines.

Application of SPME to enological products

In 1997, De la Calle and others [30] studied several different fibres in the application of SPME for the extraction of the components of wine bouquet. Polyacrylate fibres (PA-85) achieved the most complete bouquet profiles. About 90 substances were identified by capillary gas chromatography-MS and their retention factors were calculated to allow peak identification in capillary-GC-FID chromatograms. After 1 year, headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) was also studied and optimized for the GC analysis of wine aroma compounds [31] and the results were compared with those obtained using the direct sampling mode (DI-SPME) and using liquid–liquid extraction. The aromatic patterns obtained by HS-SPME-GC were applied to the chemometric classification of wine varieties. The results obtained using the three techniques were similar. However, HS-SPME presented additional advantages: a greater sensitivity in the determination of terpenoids, and the lifetime of the SPME fibre is more than three times longer than in direct sampling mode because the fibre is not in contact with the sampling matrix and thus is not contaminated by strongly polar compounds, ethanol and salts.

Tat et al. [32] studied the performance of different fibres developed in recent years for solid-phase microextraction. The fibres were evaluated for their sensitivity and repeatability; the results showed a notably different behaviour for the different solid-phases, both for the different zones of the chromatogram and for different levels of concentration. A divinylbenzene/Carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fibre coating appeared the most suitable for the analysis of the aromatic fraction of wines in its totality. For specific applications, the choice of a suitable solid-phase depends on the class of compounds to be analysed.

Whiton and Zoeklein [33] studied how the quantitation can be affected by sample matrix and sampling conditions.

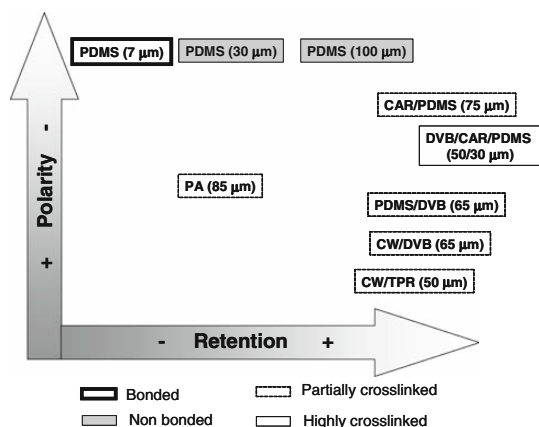


Fig. 3 Properties of the various stationary phases utilized in SPME (Reprinted from [29] with permission from Elsevier)

Tests with model solutions containing a range of typical wine volatiles demonstrated that increasing temperature and sampling time can increase sensitivity for higher boiling polar compounds but can decrease sensitivity for very volatile compounds. Sample matrix parameters such as ethanol concentration can also have different effects on the responses of different compounds. It is important to focus on the analytes of interest when optimizing sampling conditions, and to remain aware that conditions optimum for one set of compounds will not necessarily be optimum for another set of compounds.

Rocha and others [34] studied the behaviour of the SPME fibre (polyacrylate) regarding the different chemical classes of wine aroma compounds (monoterpenoids, aliphatic and aromatic alcohols, and esters). They analysed the extent of the changes in the concentration of one matrix component in the headspace equilibrium and, consequently, in the SPME sorption of the different matrix components. Relative response factors (rrfs), which establish the relationship between the concentration of the compound in the matrix liquid solution and the GC peak area, were estimated for all compounds. Quantification by SPME was shown to be highly dependent on the matrix composition; the compounds with higher "rrf" were the less affected. As a consequence, according to these authors, these limitations should be taken into consideration when using the data obtained with this methodology.

Liu and others [35] developed a new SPME coating made from butyl methacrylate (BMA), divinylbenzene (DVB) and hydroxyl-terminated silicone oil (OH-TSO) with sol-gel and free radical polymerization; this was applied for simultaneous analysis of both polar and nonpolar volatile compounds in wine. To check the matrix effects, various model wine matrices were investigated in detail. Matrix effects were compensated for by using the internal standard method and selecting the "volatile-free" wine as working standard. The method showed satisfactory linearity, precision, detection limits and accuracy.

The SPME was applied for the quantitative determination of eight aroma compounds present in a Portuguese muscatel wine must [36] and to determine aroma compounds of sparkling Cava wines (Certified Brand of Origin of Spain) [37]. In the latter they conclude that the quantities of ethyl decanoate, ethyl 2-decenoate, diethyl succinate, vitispirane, isoamyl hexanoate, isoamyl octanoate, and ethyl octanoate could be used as markers of the legal age limits of Cavas. The last three compounds also could be used to determine the approximate age of a sparkling wine.

Given that SPME is very appropriate for application in the field of volatile compounds, this technique is being widely used for the characterization of wines [38–47]. Bonino and others [45] utilized HS-SPME for the extraction of aroma compounds characterizing a Piedmont wine (Ruché)

derived from a non-aromatic wine. It proved possible to identify a selection of 59 primary aromatic compounds, related to the typical flavour of Ruché. On the basis of experimental data obtained, the skin of the grape berries were attributed with primary importance as a source of varietal aromatic precursors, which are released easily during maceration in the presence of the enzymes cellulose and pectinase. The use of solid phase extraction-GC and SPME-GC has enabled the characterisation of the volatile composition of 23 monovarietal wines from 13 white and red grape varieties cultivated in the same area [6]. The chemometric analysis of these volatile compounds reveals that it is the terpenic compounds that are related most directly to the varietal aroma, among these, specifically terpineol, linalool and geraniol. The volatile compounds generated during the alcoholic fermentation present a relatively distinct composition depending on the type of fermentation carried out, and particularly according to whether maceration of the solid parts has been performed during the process. In the case of vinification without maceration, there is a relative increase of fatty acids and their ethyl esters, whereas in vinification with maceration, the ethyl esters of lactic, acetic and succinic acids are the compounds that are relatively more abundant. Marengo et al. [46] used SPME to analyse 68 samples of wines of Piedmont (Italy). A total of 35 analytes were identified; peak area data, corrected by internal standard, were used for pattern recognition treatments. The chemical characterization of the different wines was obtained by both supervised and unsupervised chemometric methods. Also, a HS-SPME-GC procedure was used to determine the composition of the volatile fraction of white wine samples from several Spanish certified brands of origin (CBO). According to the results obtained and by applying pattern-recognition procedures differentiation of the considered CBO was attained [47].

The technique using solid-phase microextraction-mass spectrometry-principal component analysis (HS-SPME-GC-MS-PCA) is proposed for the rapid distinction of wines based on the global volatile signature of the wine [48]. Principal component analysis (PCA) was applied to extract relevant chemical information by selecting the most significant mass fragments (m/z) that provide the better wine distinction. Rodriguez-Bencomo and others [49, 50] have studied the aromatic profile of sweet wines. For determination of esters, the PDMS-100 fibre, 40 min of extraction, headspace technique, stirring, saturation in sodium chloride and 16-ml vials were selected. Sugar content did not influence the extraction which allows this technique to be applied to sweet wine samples. However, for the determination of major compounds, the CW-DVB was selected. Applying a PCA to the results obtained enabled the wines to be differentiated according to the type of elaboration process employed.

A new-generation super elastic DVB/CAR/PDMS 50/30 μm fiber assembly was used for the headspace extraction of analytes from ice wine samples, for the determination of compounds with a wide range of polarities and volatilities [51, 52]. The profiles of volatile and semi-volatile compounds in various samples of Canadian and Czech ice wine were compared using PCA for the classification of the wines according to origin, grape variety, oak or stainless steel fermentation/ageing procedures used during the wine production or aroma profile differences between ice wines and late harvest wines.

In research on wine-making processes, Riu-Aumatell and others [53] studied the development of post-fermentation aroma and its evolution in cava wines during a long ageing time in contact with lees (more than 2 years). The extraction was performed with two alternative fibres, PDMS and the triple phase DVB–CAR–PDMS. Even though the volatile profile obtained by GC/MS was similar, the triple phase seems to be more suitable for monitoring the development of the volatile profile during ageing. 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. Other authors have applied SPME to the monitoring of volatile compounds during wine fermentation [54–57].

The process of ageing in wines has also been studied using SPME. Carrillo and others [58] developed a HS-SPME-GC/MS method for the quantitative analysis in aged red wine of 14 volatile compounds from oak wood. These compounds are formed and extracted by wine when it is matured in oak barrels and are responsible for the particular organoleptic properties and high quality of these wines. The most important HS-SPME variables were optimized by experimental design technique in order to improve the extraction process. The selected conditions were as follows: 10 mL of sample in 20 mL sealed vials with addition of 30% of sodium chloride (saturated solution), DVB–CAR–PDMS fibre, 10 min of pre-incubation time, temperature of 70 °C, and 60 min of extraction time without agitation. In the same way, the SPME was used to determine the ability of caffeic acid and gallic acid to inhibit the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium [59]. The HS-SPME was proposed for analysing the main volatile components from a sensory standpoint present in non-toasted and toasted oak wood of different origins [60]. The results obtained makes the proposed technique appropriate for its use in characterizing oak wood samples of different origins and in the selection of the most suitable oak wood to age wines and spirits, on the basis of the chemical composition of the wood samples. For the study of this type of compounds, Carrillo and Tena [61] developed a method for quantification by multiple

headspace solid-phase microextraction (MHS-SPME). This technique is based on extrapolation to exhaustive extraction of the analytes from consecutive extractions (3 or 4) of the same sample. The method was applied in the analysis of volatile compounds in oak chips used to accelerate wine ageing as an alternative to traditional ageing in oak barrels [62].

The SPME has been compared with various other separation techniques. For example, Castro and others [63] compared it with rotary and continuous liquid–liquid extraction (LLE) and applied both techniques to the analysis of volatile compounds in “fino” sherry wine. The best conditions to extract these compounds using SPME and LLE were determined, and both methods were validated. No significant differences between results obtained by the two methods were found at a significance level of 5%. The LLE procedure is a method with high repeatability and offers the possibility of simultaneous extraction of several samples (up to 12); however the SPME technique is a solvent-free method presenting major advantages, such as small sample volume and higher sensitivity and simplicity. Bohlscheid and others [64] compared SPME with a SPE method using Amberlite XAD-2 resin for the extraction of volatile compounds. HS-SPME and XAD-2 performed similarly in the analysis of a Riesling wine; however, the HS-SPME method did not require organic solvents and was generally quicker to perform.

In respect of the use of SPME for the analysis of particular families of compounds in wines, its application to sulphurated compounds has been described. Volatile sulphur compounds play an important role in the aromata quality of foods and beverages. They are commonly found in foods that are in bad condition, giving them unpleasant flavour. From the enological point of view, these compounds, when present in wines are usually considered as off-flavours, and this means that the conditions under which the wines were produced were wrong. Mestres et al. [65] performed various studies in which they applied SPME for the analysis of these compounds in wines. HS-SPME has been combined with gas chromatography coupled to flame photometric detection (GC-FPD) to analyse volatile sulphides and disulphides. In one of the studies [66] it is concluded that the CAR-PDMS fibre was more efficient at extracting than other fibres like PDMS and PA, but its repeatability was worse. In another study [67] they analysed simultaneously sulphides and disulphides in wine aroma, applying a cryogenic trap to resolve the problems caused by poor desorption of the most volatile S-compounds. Later, they also analysed low-volatility organic sulphur compounds in wine by SPME [68, 69]. Similarly, Fang and Qian [70] developed a method for the analysis of these compounds based on SPME and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. This technique has proved to be very sensitive

for sulphur compounds, and uses a pulsed flame, rather than a continuous flame as with traditional FPD, to achieve the generation of flame chemiluminescence. In the same way, 13 sulphur compounds, usually considered as possible off-flavouring volatiles, were quantified by a HS-SPME method on 80 not off-flavouring wines of four varieties and of five vintages produced in the North Italian Trentino region [71]. Also López and others [72] developed a method based on the automated HS-SPME sampling of small volumes of wine with CAR-PDMS fibers and subsequent GC-PFPD for the quantitative determination of highly volatile sulfur compounds present in wine. This method less sensitive to matrix effects.

In the case of volatile phenols, Martorel et al. [73] developed a method of analysis of ethylphenols in red wine utilizing SPME. The fibres used were coated with 100 μm of polydimethylsiloxane (PDMS). Castro and others [74] optimized a SPME method for ethylphenols and vinylphenols in white and red wines. Silica fibre coated with Carbowax-divinylbenzene (CW-DVB) was found to be more efficient at extracting these compounds, Fig. 4.

Methoxypyrazines are extremely potent odorants found in vegetables such as bell peppers and french beans and is an important wine grape flavour compound in varieties such as Cabernet Sauvignon and Sauvignon blanc. They have a vegetative, herbaceous odour, similar to bellpepper, and a very low sensory threshold of between 1 and 10 ng/L in water. Sala et al. [75] have developed a method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of gas chromatography with nitrogen–phosphorous detection (GC-NPD) with HS-SPME. It provides high recoveries, detection limits at the 0.1–1 ng/L level and a linearity range of 2–100 ng/L. The method has been applied to experimental musts of Cabernet Sauvignon and Merlot, and analytes have been monitored during the ripening and at harvest. In another study, these authors utilized the same technique after a sample clean-up by distillation to remove ethanol and other volatile compounds that could interfere in the SPME [76]. SPME with stable isotope dilution has been

applied for quantification of methoxypyrazines in wines [77, 78]. Ryan and others [79] optimized a HS-SPME method for the determination of methoxypyrazines in wine. Analysis was performed using comprehensive two-dimensional gas chromatography with novel detection capabilities, including nitrogen phosphorus detection (GCxGC-NPD) and time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS). In the latter, stable isotope dilution was performed for the quantitation of 2-methoxy-3-(2-methylpropyl) pyrazine (IBMP), using labelled 2-(2H3)methoxy-3-(2-methylpropyl)pyrazine as the internal standard, and resolution of the two analogues was facilitated using the deconvolution capabilities of the TOFMS. Both the techniques were highly sensitive, yielding detection limits for IBMP of 0.5 and 1.95 ng/L, respectively. Quantitation of IBMP in a Sauvignon blanc wine by the two techniques provided comparable concentrations indicating that the HS-SPME method was unaffected by wine matrix effects.

In respect of cork taint compounds analysis, there are several examples of the use of SPME for this purpose [80–98]. Martínez-Uruñuela et al. [89, 90] optimized an acetylation reaction for the derivatisation of chlorophenols using a Doehlert design for direct application in wine samples. The final objective of this reaction is to transform chlorophenols into less polar compounds thus improving their chromatographic performance. In the derivatisation reactions, chlorophenols can be transformed into the corresponding esters using acetic anhydride. Also Pizarro et al. [91] use a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatisation method for the direct determination of haloanisoles and halophenols in wine. Insa et al. [92] developed and applied two methodologies based on SPE and SPME coupled to GC-electron-capture detection to determine TCA, TeCA and PCA in cork macerate and wine samples. For this purpose, a C18 cartridge and a styrene-divinylbenzene-based sorbent were evaluated under different experimental conditions. In addition, a SPME method using a PDMS fibre was optimized to achieve the best extraction conditions for the chlorophenolic compounds. The same authors [93] did a comparative study to check the matrix effect on the extraction of three chlorophenols in synthetic and commercial wines (white and red wines). The matrix effect also has been studied by Vlachos et al. [94] and Pizarro et al. [95] that were identified causing significant bias to the quantitative analysis. Gómez-Ariza et al. [96] compared the multiple HS-SPME and GC-MS with several analytical approaches based on pervaporation, an innovative membrane-based technique similar to dynamic headspace. In the pervaporation approach the introduction of the membrane contributes to the matrix elimination before the sorption step; in MHS, the multiple extractions involved in the process reduce the matrix effect. In 2006, Riu et al. [97] developed a method for quantifying the total endogenous chloroanisoles in the differ-

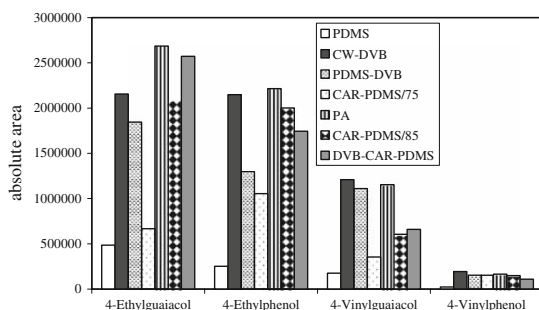


Fig. 4 Fibre Screening. Peak areas (mean values) obtained for each volatile phenol

ent kinds of cork by using a 50/30 μm stableflex divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) SPME fibre and GC with electron capture detector. This method was applied to analyse the total amount of chloroanisoles in different kinds of cork stoppers (natural, agglomerated and sparkling wine stoppers) [98].

Also the SPME has been used to quantify by internal standardization 18 molecules that are of interest because they have been identified as being responsible for a large number of faults encountered in today's wine industry [99]. In the same way, a method was developed for the simultaneous analysis of volatile compounds responsible for off-flavours in cork-stoppered wines [100].

Another important aspect of the use of SPME for volatiles in wines is its application to the determination of terpenes and similar compounds. Peña et al. [101] developed a method for the analysis of certain terpenes in wine samples using SPME and GC-MS. The best results were obtained by direct immersion of the fibre using a sampling period of 15 min with constant magnetic stirring. Later, these authors [102] compared the method with ultrasound-assisted extraction (UAE). The application of both methods to red wine samples showed that UAE provides better extraction of monoterpenic compounds than SPME, although SPME remains an attractive alternative technique due to its speed, low sample volume requirements and solvent free character. Camara and others [103] developed a method based on HS-SPME for the determination of trace levels of terpenoid compounds in samples of must and Madeira wine, a liquorous wine with an alcoholic content of 18% (v/v). The best results were obtained using a 85- μm polyacrylate fibre, with a 60-min headspace for must and 120 min for wine samples. Thirty-six Madeira wine samples from white grape varieties were analysed in order to estimate the free fraction of monoterpenols and C13 norisoprenoids [104].

In addition to utilizing SPME for the analysis of families of compounds, SPME is also used for the analysis of specific individual compounds in wine that have a particular importance, for several reasons, in the control of wine-making processes. Hayasaka and Bartowsky [105] developed a method to analyse diacetyl, one of the important flavour compounds in dairy products as well as wine. The presence of diacetyl in wines is usually associated with malolactic fermentation, a process which can occur simultaneously with or following the alcoholic fermentation.

In respect of the analysis of vinegar, Castro et al. [106, 107] applied HS-SPME to the analysis of aroma compounds in this enological product. Silica fibre coated with CAR-PDMS was found to be more efficient than other fibres at extracting these compounds. The extraction efficiency was inversely affected by the acetic acid content—an increase in the acetic acid concentration decreases the extraction efficiency. No interference is observed with

the increase in content of polyphenols. The method was applied to various Sherry wine vinegars.

As important as obtaining a specific quality of a vinegar is the need to determine objectively the appropriate parameters that allow us to characterize and differentiate one vinegar from another. With this objective, Natera et al. [1] developed several pattern recognition approaches that permit classification of vinegar samples according to raw material (wine, cider, alcohol, etc.) and production process, using different analytical parameters, such as polyphenolic content, organic acids, and volatile compounds. Volatile compounds were determined by SPME and GC. Also Pizarro et al. [108] use the volatile compounds to classify different vinegar types. The collected chromatographic signals were analysed using the stepwise linear discriminant analysis method, thus simultaneously performing feature selection and classification.

Cocchi and others [109] applied a feature selection and classification algorithm based on wavelet packet transform to the discrimination of balsamic vinegars. All the samples have been characterized on the basis of the gas chromatographic profiles of the headspace volatile fraction, sampled by SPME.

Furan derivatives are characteristic of the caramel-like flavour of Italian traditional balsamic vinegar. They are formed with Maillard reactions (or non-enzymatic browning) between reducing sugars and amino acid that occur during the cooking of the grape must and during the ageing period. The presence of 2-furfural and 5-methylfurfural in balsamic vinegar is normal and some producers are interested in determination of the level of these molecules in the finished product in order to evaluate organoleptic properties and detect possible commercial frauds. Giordano and others [110] developed a method for the determination of 2-furfural and 5-methylfurfural in vinegar, with HS-SPME coupled to GC-MS. A DVB-CAR-PDMS fibre was used and SPME conditions were optimized, studying ionic strength effect, temperature effect and adsorption time. Isotope dilution calibration was performed, using 2-furfural-d4, so avoiding the standard additions method.

The SPME has also been applied to the study of the volatile compounds of brandy. Brandy aroma is influenced by the environment in which the grapes are grown, grape variety, grape maturity, fermentation processes, distillation conditions and, most importantly, the duration of the ageing process and ageing temperature, as well as by the use of oak barrels and the relative humidity in the barrel house. Ebeler et al. [111] utilized SPME to analyse the volatile composition of brandy, comparing the results to a traditional continuous liquid-liquid extraction procedure. In addition, a combination of SPME with GC-olfactometry was used to provide more detailed information on sensory characteristics of varietal brandies.

Watts and Butzke [112] applied SPME for quantifying methylketone concentrations in a large number of commercially available Cognacs to find possible correlations with other volatiles and to confirm the suitability of methylketones as an impact compound group to assess the quality of premium brandies. Soon after, these same authors [113] utilized a method of SPME and GC-MS and partial least-squares (PLS) regression to predict sample age and to separate Cognacs of different ages using only chromatographic peak areas. The subset consisting of 17 volatiles (13 ethyl esters and 4 methyl ketones) could predict sample age with a high degree of accuracy.

Also the SPME has been applied for the determination of volatile and semi-volatile compounds from different alcoholic beverages: beer and whisky [114].

SBSE

The technique termed sorptive extraction using a stir bar agitator (SBSE) is based, like SPME, on the use of an apolar sorbent polymer, polydimethylsiloxane (PDMS), as the medium of extraction of analytes in liquid and gaseous samples. PDMS presents a series of characteristics that have made it the sorbent material most commonly used for this type of technique. These include, in particular, its inert character, which reduces the risk that compounds may be generated on its surface; the relative ease with which it can be synthesized, and therefore the inevitable differences between the various manufacturers in respect of consistency and reproducibility are minimized; and the degradation products are fairly easy to identify by mass spectrometry.

SBSE is not the first technique to be based on the use of PDMS as extraction medium. Before SBSE appeared, researchers developed various other techniques, some of which will be mentioned next. The first to be developed was open tubular trapping (OTT) [115]. This technique utilizes a type of open capillary column, with PDMS on its internal wall. Subsequently the previously mentioned SPME [116] was developed; this method, as already explained, operates through the PDMS available on the surface of the needle of a device similar to a syringe. And later, but prior to SBSE, the gum-phase extraction (GPE) was developed, based on the use of packed beds formed from particles of 100% PDMS [117].

Finally, at the beginning of the 1990s, a method of extraction by sorption using a stir bar was developed (SBSE); this method offered the sensitivity of the PDMS packed beds, and the range of application (in terms of volatility) of SPME [118]. A stir bar was incorporated into a glass tube with an external diameter of 1.2 mm, and coated with a 1-mm thick layer of PDMS, providing a total width

to the stir bar of 3.2 mm external diameter. The stir bars are introduced into the aqueous samples and the extraction takes place through the agitation or stirring generated by the bar within the liquid. The quantity of PDMS can vary with the length, which is typically from 10 mm (55 μ L of PDMS) to 40 mm (219 μ L of PDMS), which are applied, respectively, to small and large volumes. After a specified time of agitation/stirring, the bar is removed from the sample, is placed inside a glass tube, and is then transferred to a thermal desorption instrument (TDS), where the analytes are thermally removed from the bar. Subsequently a process of cryoconcentration takes place (normally with liquid nitrogen), so that the analytes are concentrated again before entering the chromatograph. Using this procedure much narrower analytical peaks are obtained. Finally, and after the application of heat, the analytes are transferred, in the majority of cases, to a gas chromatograph coupled to detection by mass spectrometry.

The SBSE presents a series of clear advantages over the rest of the extractive techniques described in this review. For a start, this technique is solvent-free, unlike SPE. This brings various additional advantages: the samples are not in contact with any solvent, and so are less likely to be altered by contamination or the formation of artefacts during the extraction process. For this same reason, the technique is much friendlier to the natural environment, since it does not generate residuals of any kind. Another advantage of this technique is that it can be almost completely automated thus making it very simple and fast to apply repeatedly. The technique requires almost no handling of the sample on the part of the analyst, nor does it require prior treatment of the sample. This means that the possibility of analytical error is considerably reduced. Compared with SPME, SBSE provides greater analytical sensitivity: it reaches much lower detection and quantification limits. The reason for this is that, in SBSE, the quantity of PDMS employed is rather greater, with the result that the extractive capacity is also greater.

Against this, and due also to the use of the PDMS, SBSE presents a clear disadvantage compared with other extractive techniques. This is the limited extraction capacity of PDMS for polar substances, given its marked apolar character, and PDMS is the only sorbent utilized to date in SBSE. This problem is palliated to some extent since the quantity of PDMS used in the technique is relatively large, and it is due to this that PDMS manages also to extract substances of polar character, although less efficiently. Another disadvantage is that, due to the nature of the technique, a prior process of optimization is required, both of the extraction conditions (extraction time, speed of stirring, temperature, etc.) and of the conditions of desorption (temperature of desorption, time of desorption, temperature of cryoconcentration, etc.) for each specific case.

The effect of this is that the technique cannot be immediately applied to a case that has not been previously studied.

Application of SBSE to enological products

Most of the applications of this technique to the determination of volatile compounds in enological products are focused on wine as the object of analysis, including both white and red wine, and wine of different Denominations of Origin. However, in addition to wine, there are also studies that make reference to vinegar, grapes and must.

Due to their negative influence on the flavour, the analysis of TCA in wines using SBSE has been studied by several authors [119, 122]. In a study of Zalacaín et al. [121], not only was the presence of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) detected, but a method of analysis was also developed that dispensed with the preconcentration stage and offered a relatively short time for analysis (2 h), for the detection and quantification of TCA, 2,3,4,5-tetrachloroanisole, (TeCA), 2,3,4,5,6-pentachloroanisole (PCA) and their respective phenols in samples of red and white wine. The optimized extraction conditions were 10 ml of sample, stirred at 700 rpm for one hour, at ambient temperature, and adjusting the pH to 3.6. The SIM mode of quantification was also utilized. Lower values of detection and quantification than any that had previously been obtained were achieved, with concentrations lower than their olfactory threshold values. Another recent study by Lorenzo et al. [122] dealt with identifying the presence of halophenols and haloanisoles in enological products by means of SBSE; these compounds are specifically derived from cork stoppers used for the bottling of wines. In this case the technique known as headspace sorptive extraction (HSSE) was employed as an extension of SBSE; this was developed by Tiepont et al. [123]. This variation is based on inserting the stir bar only into the headspace of the solution to be analysed, not in the actual liquid, but the analytes are retained by the PDMS in the same way, Fig. 5. For the optimization of the extraction conditions, the authors injected a solution of TCA into synthetic wine, on the end of a cork stopper. It was found that the best results were obtained after submitting the spiked corks to 100 °C for 1 h, followed by a stabilisation time of 30 minutes at room temperature. The method presented good linearity in the range of 1–70 ng/g, and coefficients of correlation of 0.90 and 0.99; reproducibility and repeatability values were also acceptable. In relation to the analysis of chloroanisoles and chlorophenols in enological products, it has also been applied directly to cork material [124].

The analysis of volatile compounds in wine by means of SBSE, has been studied by several ways. It has been applied to wines aged in oak wood casks [125], to study the wine primary aroma compounds [126] or to study the possible effect of grape maturity on wine aroma [127]. Díez et al.

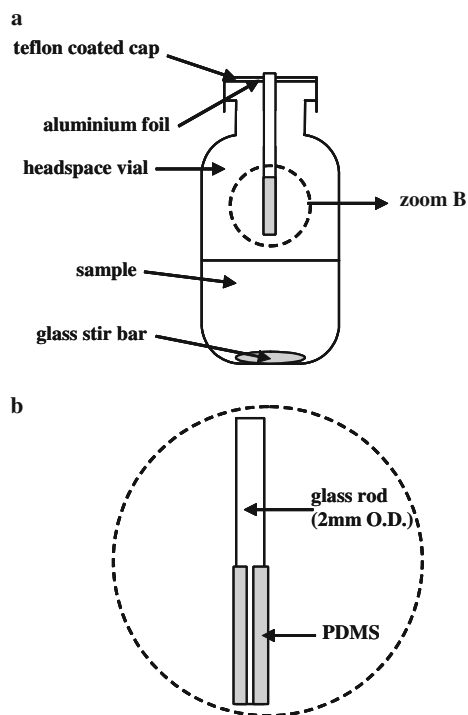


Fig. 5 Headspace sorptive extraction (HSSE) sampling setup: headspace vial (a), and detail of the HSSE-PDMS bar (b)

[128] devised a method of analysis using stir bar sorptive extraction for the quantification of the volatile phenols 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol. The following conditions of extraction were optimized for this case: the dilution of the sample was 1:4; the sample volume was set at 15 ml of diluted wine; extraction time was 60 min; the speed of stirring was 900 rpm; and NaCl was not added to the samples. The method was validated analytically, and good values, not only of r^2 (higher than 0.9964), but also of linearity, RSD, recovery, sensitivity/detection limits and quantification were obtained. Unlike the preceding case, here the SIM mode was used exclusively for the quantification, and this contributed to lowering the detection limits. The method optimized was applied to various samples of red and white wines and fino sherry.

The SBSE has also been used jointly with SPME. Alves and others characterized the aromatic profile of Madeira wine, using these two techniques, both coupled to GC/MS [129]. While SPME was used for identifying the majority components of the aroma of Madeira wine, SBSE, being more sensitive, was used for the determination of the minority components of the aroma, which play a very important role in the aromatic complexity of this wine and

are most important for the bouquet. Among the families of compounds that were studied by SBSE, we find esters, carboxylic acids, alcohols, aldehydes, pyrans, lactones, monoterpenes, sesquiterpenes and C13 norisoprenoids. The authors found that there was an excellent correlation between the length of ageing of the wine and the abundance of the compound designated *cis*-oak lactone; hence it was concluded that this compound is a valuable descriptor for characterising aged Madeira wines, in addition to it contributing to the aroma of the wine. The results obtained by SBSE allowed different types of wine from Madeira to be differentiated by employing the wines' content in volatile compounds.

Komes et al. [130] carried out a comparative study to determine which extraction technique was best to replace the commonly-used liquid-liquid extraction with 1,1,1-trichlorofluoromethane, for isolating the volatile compounds of white wine prior to their analysis by gas chromatography. SPME and SBSE, as well as liquid-liquid extraction, were compared. The authors found that, although both SBSE and SPME offered the possibility of automating the procedure, using a small sample volume, and a rapid and simple handling, the recovery of the aromatic compounds was restricted, given the properties of discrimination of the polymeric phase. However, the results obtained by SBSE were more similar to those by liquid-liquid extraction than those obtained by SPME.

Kittel and others [131, 132] used SBSE coupled to gas chromatography/olfactometry (GC/O) to study a series of wines in which unwanted changes related to the aroma had been detected. The "untypical" ageing aroma (UTA), as it is commonly called, is produced due to oxidative changes in the aromatic compounds of the wine, and it is very common to find it in various types of European wine. Thanks to the application of SBSE, the authors reached the conclusion that, although UTA could occur in American wines, it was not due to the presence of the compounds that were thought to be responsible, since these were found below the limit of detection of the technique.

The study of preservative compounds in various food samples including white and red wines and balsamic vinegars have also been performed using SBSE [133]. With reference to vinegar as the exclusive object of study, Pfannkoch and Whitecavage [134] applied SBSE/GC/MS to the determination of the particular volatile compounds present in the aroma of balsamic vinegar, among other matrices. By using this technique, the interferences and problems derived from the presence of the more polar components of the matrix were eliminated.

In 2006, a new application of SBSE related to vinegars has appeared in the bibliography; Durán Guerrero et al. [135] have proposed and evaluated a method for the analysis of volatile compounds in vinegars. Using chemometric

tools, the authors optimized the analytical conditions of both extraction and desorption. They conclude that the best analytical conditions of extraction are 25 ml of sample without dilution, stirring for 120 min at 1,250 rpm, and the addition to each sample of 5.85 g of NaCl. The optimum analytical conditions of desorption are as follows: a desorption temperature of 300°C, maintaining this maximum temperature for 10 min, a flow of helium of 75 ml/min during this process, and a temperature of -140 °C in the subsequent cryoconcentration. Using this method adequate values of linear range and of detection limits were obtained for the study of the volatile compounds present in vinegar. In a later work [136], the authors validated the method and compared this methodology with another one based on SPME [106, 107]. The amount of studied compounds was increased in this second study. Lower detection and quantitation limits and better repeatability and reproducibility values were obtained for SBSE. Also better sensitivity was observed for SBSE, due to its greater capacity of extraction, Fig. 6.

Focusing their study on the volatile compounds present in the original grapes, Salinas et al. applied stir bar sorptive extraction to the evolution of the volatile compounds during the maturation of grapes of the Monastrell variety [137]. Luan et al. [138] applied the technique to different varieties of grape during their maturation, for the analysis of monoterpenes (more specifically, metabolites of linalol and of citronellol). These authors made use of SBSE for the analysis of those compounds that had the lowest concentration (of the order of ppb), while for the rest of the compounds, they used solid phase extraction as the method of isolation. Because there were stereoisomers among the analytes studied by the authors, the technique known as enantioselective-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry was used, coupled to the extraction procedures previously described. With this technique the authors managed to separate the stereoisomers of the metabolites studied, using for this a second chiral column with a modified cyclodextrin as stationary phase, Fig. 7. This enabled them to determine the stereoisomeric ratios of the analytes studied, which can be of interest for monitoring the authenticity of the aroma of the grape or wine. This is the first reference found in the bibliography where SBSE is used coupled to a multidimensional chromatographic system; this system has enabled the elucidation of two different reaction routes for the formation of several key analytes in the maturation of the grape.

A new study dealing with SBSE and volatile compounds in enological products, carried out by Caven-Quantrill and Buglass [139] has been published. The authors compare the SBSE technique with the traditional micro-scale simultaneous distillation-extraction (SDE) for the analysis of volatile compounds in grape must. The conditions of extraction

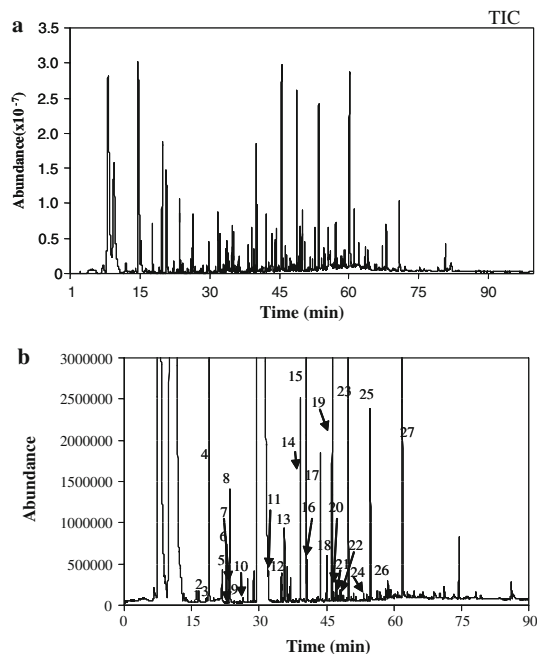


Fig. 6 Total ion chromatogram obtained for a vinegar sample by means of SBSE and SPME. **a** SBSE Retention times (min): Ethyl isobutyrate (13.62); propyl acetate (13.99); isobutyl acetate (15.76); ethyl butyrate (16.84); *n*-butyl acetate (18.38); ethyl isopentanoate (18.46); hexanal (18.70); isobutanol (19.71); isopentyl acetate (20.57); ethyl pentanoate (20.77); 1-butanol (21.84); *trans*-2-hexenal (24.01); isoamyl alcohol (23.84); 2-methyl-1-butanol (24.12); ethyl hexanoate (24.65); hexyl acetate (25.80); 3-hydroxy-2-butanone (26.62); *cis* 3-hexenyl acetate (27.59); ethyl lactate (28.51); hexan-1-ol (28.87); *cis*-3-hexen-1-ol (30.04); *trans*-2-hexen-1-ol (30.82); ethyl octanoate (31.87); 2-furaldehyde (32.87); benzaldehyde (35.15); isobutyric acid (36.84); 5-methyl-2-furaldehyde (36.95); 2-acetyl-5-methylfuran (38.54); butyric acid (38.89); isovaleric acid (40.28); diethyl succinate (40.58); α -terpineol (41.51); benzyl acetate (42.64); ethyl-2-phenyl acetate (44.59); phenylethyl acetate (45.95); hexanoic acid (46.57); benzyl alcohol (47.03); 2-phenylethanol (49.21); 2-ethyl hexanoic acid (50.17); 4-ethylguaiaicol (52.87); octanoic acid (53.75); eugenol (57.21); 4-ethylphenol (57.36); 5-acetoxymethyl-2-furaldehyde (58.00); decanoic acid (60.39); diethyl fialate (63.87); 5-hydroxy-methyl-2-furaldehyde (68.90). **b** SPME 1 *n*-butyl acetate; 2 ethyl pentanoate; 3 2-methyl-1-propanol; 4 isoamyl acetate; 5 4-methyl-2-pentanol (IS); 6 ethyl hexanoate; 7 2-methyl-1-butanol; 8 isoamyl alcohol; 9 hexyl acetate; 10 3-hydroxy-2-butanone; 11 2-furancarboxaldehyde; 12 benzaldehyde; 13 2,3-butanediol; 14 ethyl decanoate; 15 isovaleric acid; 16 diethyl succinate; 17 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene; 18 ethyl-2-phenyl acetate; 19 phenylethyl acetate; 20 hexanoic acid; 21 α -ionona; 22 benzyl alcohol; 23 2-phenylethanol; 24 4-ethylguaiaicol; 25 octanoic acid; 26 4-ethylphenol; 27 decanoic acid

and desorption for the SBSE method, optimized using a synthetic must were the following: for the extraction a stirring time of 2 h at 1,000 rpm was used; for the desorption process, on the one hand, a final desorption temperature of 300 °C (for 5 min) and a helium flow of 70 ml/min were utilized, and on the other, in the cryogenic trap system, the

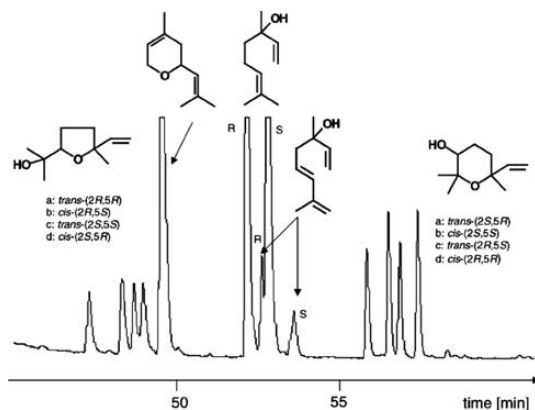


Fig. 7 Second dimension column chromatogram illustrating the separation of a standard mixture (in the order of their elution times): furanoid linalool oxide, nerol oxide, linalool, hotrienol, pyranoid linalool oxide. (Reprinted from [138] with permission from Elsevier)

cryoconcentration temperature was -50 °C and the final temperature was 260 °C (for 20 min). When they compared the two methods, the authors found that SBSE gave lower recovery and reproducibility values than SDE; however, the first of the methods was rather more sensitive, with 126 volatile compounds being identified in samples of real must, against 98 compounds identified using SDE; SBSE also presented the advantages already known, such as the rapidity and simplicity of the analysis, the scope for being automated, and the fact that solvents are not needed.

The following table, Table 2, shows some of the analytical conditions employed by various authors for the analysis of volatile compounds in the different matrices studied.

SPDE

The origin of SPDE lies in various attempts made to overcome some of the disadvantages of SPME, such as the fragility of the fused silica, unprotected stationary phase coating and limited film thickness.

In 2000, Chromtech (Idstein, Germany) commercialized an inside-needle technique known as solid-phase dynamic extraction (SPDE). It is also known as the “magic needle”. In this headspace technique, the analytes are concentrated on a film of different coatings onto the inside of a stainless steel needle of a gas syringe (Fig. 8). Different commercially available SPDE needle coatings with different polarities can be found: polar polyethylene glycol WAX phase (50 μ m film thickness and 56 mm film length), cyanopropylphenyl/polydimethylsiloxane phase (50 μ m film thickness and 56 mm film length), non-polar polydimethylsiloxane phase (PDMS, 50 μ m film thickness and 56 mm film length) and polydimethylsiloxane with 10%

Table 2 SBSE analytical conditions used to analyse volatile compounds in enological products

Authors	Matrix	Analytes	Extraction analytical conditions
Sponholz et al. [119]	Wine	2,4,6-Trichloroanisole	–
Hayasaka et al. [120]	Wine	2,4,5-Trichloroanisole; flavour; agrochemicals.	Sample volume: 10 ml; stirring speed: 700 rpm; extraction time: 90 min.; extraction temperature: 25 °C
Zalacain et al. [121]	Wine	Chloroanisoles	Sample volume: 10 ml; stirring speed: 700 rpm; extraction time: 60 min.; extraction temperature: room temperature; pH: 3.6
Lorenzo et al. [122] (HSSE)	Cork stoppers	Halophenols and haloanisoles	Extraction temperature: 100 °C; extraction time: 60 min.; stabilization time: 30 min.
Callejón et al. [124]	Cork stoppers	Chloroanisoles and chlorophenols	Previous extraction: 24 hours using 75%-ethanol/25%-water. Sample volume: 1 ml of diluted extract; stirring speed: 700 rpm; sample dilution: 1:10; extraction time: 60 min; pH: 3.6
Marín et al. [125]	Oak-aged wine	Flavour	Sample volume: 25 ml; stirring speed: 700 rpm; extraction time: 90 min; extraction temperature: room temperature.
Zalacain et al. [126]	Wine	Flavour	Sample volume: 25 ml; stirring speed: 700 rpm; extraction temperature: 60 °C; extraction time: 90 min
Fang et al. [127]	Wine	Flavour	Sample volume: 10 ml of diluted wine; stirring speed: 1000 rpm; sample dilution: 1:2; extraction time: 12 hours; NaCl addition
Díez et al. [128]	Wine	Volatile phenols	Sample volume: 15 ml of diluted wine; stirring speed: 900 rpm; sample dilution: 1:4; extraction time: 60 min
Alves et al. [129]	Wine	Flavour	Sample volume: 10 ml of diluted wine; stirring speed: 800 rpm; extraction temperature: 20 °C; sample dilution: 1:2; extraction time: 60 min
Komes et al. [130]	Wine	Flavour	–
Kittel et al. [131, 132]	Wine	Off-aromas	–
Ochiai et al. [133]	Wine and balsamic vinegar	Preservatives	Sample volume: 10 ml; stirring speed: 1000 rpm; extraction temperature: 25 °C; extraction time: 120 min.; pH: 1.5; NaCl addition
Pfannkoch et al. [134]	Balsamic vinegar	Flavour	–
Duran Guerrero et al. [135, 136]	Vinegar	Flavour	Sample volume: 25 ml; stirring speed: 1250 rpm; extraction time: 120 min.; NaCl addition.
Salinas et al. [137]	Grapes	Flavour	• Maceration. Sample amount: 200 g.; Maceration time: 120 min • Extraction. Sample volume: 100 ml of diluted crushed grape; stirring speed: 700 rpm; sample dilution: to 1 L.; extraction time: 360 min. Stirring speed: 450 rpm; extraction temperature: room temperature; extraction time: 30 min.; pH: 4
Luan et al. [138]	Grapes	Monoterpenes	–
Caven-Quantrill and Buglass [139]	Grape juice	Flavour	Sample volume: 20 ml; stirring speed: 1,000 rpm; extraction temperature: room temperature; extraction time: 120 min

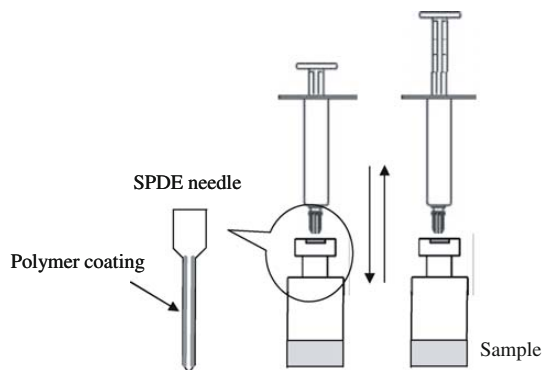


Fig. 8 SPDE sampling device

embedded activated carbon phase (PDMS/AC, 50 μm film thickness and 56 mm film length).

The volume of coatings on the SPDE needle wall is about 4.5 μl in comparison with about 0.6 μl for a SPME fibre. Thanks to this volume, SPDE achieves a higher concentration capability.

Analytes are accumulated in the polymer coating by pulling in and pushing out a fixed volume of the headspace of the sample for a predetermined number of times. Thus SPDE operates under dynamic conditions, keeping constant the headspace volume. Then analytes are thermally desorbed by a flow of helium or nitrogen into the GC injector.

The main difference between SPDE and SPME is that the first is a non-equilibrium sampling method. SPDE must therefore be carried out under rigorous standard conditions in order to obtain reliable results, in particular for quantitative analysis.

A review discussing the technological aspects and some general applications of this technique has been lately published [140].

Application of SPDE to enological products

To date, SPDE has been applied to different analytes in diverse matrices [141–146]. Bicchi et al. [141] applied this technique to analyse the volatile fraction of different food matrices: rosemary leaves, coffee, banana, and red and white wines. In this study, several parameters such as sampling temperature, number of aspiration cycles, plunger speed and aspired volume for each cycle, helium desorption volume and desorption plunger speed, were evaluated. For extraction, all samples were maintained at 50 $^{\circ}\text{C}$ for 15 min, except for banana, which was sampled at 35 $^{\circ}\text{C}$. The number of aspiration cycles was established at 50, whereas the aspiration plunger speed was fixed at 50 $\mu\text{L/s}$. A total of 1 ml of helium was employed for desorption. The plunger speed for desorption was 15 $\mu\text{L/s}$. These last two

parameters were carefully studied because they influence recovery. A low plunger speed is necessary for the complete desorption of the analytes into the helium stream. It involves a higher desorption time and a low initial oven temperature to concentrate the desorbed analytes. These authors used 20 $^{\circ}\text{C}$ as initial oven temperature for all matrices, with the exception of banana (0 $^{\circ}\text{C}$). Under these conditions, good repeatability with RSD values lower than those obtained using SPME was obtained.

Jochmann et al. [147], after the optimization of certain extraction parameters have applied SPDE for the determination of fusel oils in alcoholic beverages such as beer, wine, brandy and rum. The extraction temperature was set as 70 $^{\circ}\text{C}$. All analytes showed stable responses after 50 extraction cycles and the addition of salt produced significantly higher extraction efficiencies. Using these conditions and a WAX phase, the RSD values ranged from 2 to 14%. The polar WAX phase and non-polar polydimethylsiloxane with embedded activated carbon were more efficient for the extraction of fusel oils. Taking into account the high sensitivity of the technique, the authors indicate that the samples can be diluted to suppress a possible matrix effect.

In general, a significant advantage of SPDE over SPME is the robustness of the capillary, together with a higher sensitivity of this technique.

References

- Natera R, Castro R, Moreno MVG, Hernández MJ, Barroso CG (2003) *J Agric Food Chem* 51:3345–3351
- Morales ML, González GA, Casas JA, Troncoso AM (2001) *Eur Food Res Technol* 212:676–682
- Lee SJ, Rathbone D, Asimont S, Adden R, Ebeler SE (2004) *Am J Enol Vitic* 55:346–354
- Hernández-Orte P, Ibarz MJ, Cacho J, Ferreira V (2005) *Food Chem* 89:163–174
- Plata C, Mauricio JC, Millan C, Ortega JM (2005) *World J Microb Biot* 21:115–121
- Piñeiro Z, Natera R, Castro R, Palma M, Puertas B, Barroso CG (2006) *Anal Chim Acta* 563:165–172
- Cela R, Loreno RA, Casais MC (2002) *Técnicas de separación en Química Analítica. Síntesis*, Madrid
- Culleré L, Aznar M, Cacho J, Ferreira V (2003) *J Chromatogr A* 1017:17–26
- Wada K, Shibamoto T (1997) *J Agric Food Chem* 45:4362–4366
- López R, Aznar M, Cacho J, Ferreira V (2002) *J Chromatogr A* 966:167–177
- Edwards CG, Beelman RB (1990) *J Agric Food Chem* 38:216–220
- Genovese A, Dimaggio R, Lisanti MT, Piombino P, Moio L (2005) *Ann Chim* 95:383–394
- Lukic I, Banovic M, Persuric D, Radeka S, Sladonja B (2006) *J Chromatogr A* 1101:238–244
- Ferreira V, Ortega L, Escudero A, Cacho JF (2000) *J Chromatogr Sci* 38:469–476
- Dieguez SC, Díaz LD, De la Peña ML, Gómez EF (2002) *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 35:452–457
- Karagiannis S, Economou A, Lanaridis P (2000) *J Agric Food Chem* 48:5369–5375

17. Piñeiro Z, Palma M, Barroso CG (2004) *Anal Chim Acta* 513:209–214
18. Ferreira V, López R, Cacho JF (2000) *J Sci Food Agric* 80:1659–1667
19. Ferreira V, Jarauta I, Ortega L, Cacho J (2004) *J Chromatogr A* 1025:147–156
20. Campo E, Cacho J, Ferreira V (2007) *J Chromatogr A* 1140:180–188
21. Insa S, Anticó E, Ferreira V (2005) *J Chromatogr A* 1089:235–242
22. Culleré L, Cacho J, Ferreira V (2006) *Anal Chim Acta* 563:51–57
23. Domínguez C, Guillén DA, Barroso CG (2002) *Anal Chim Acta* 458:95–102
24. Casas J (1985) III Jornadas Universitarias sobre el Jerez. In Jimenez-Mena A (ed) Proceedings of the University of Cadiz, University of Cadiz Press, Cadiz, pp 333–361
25. Charles M, Martin B, Ginies C, Etievant P, Coste G, Guichard E (2000) *J Agric Food Chem* 48:70–77
26. Morales ML, Benítez B, Troncoso AM (2004) *Food Chem* 88:305–315
27. Pawliszyn J (1997) *Solid phase microextraction. Theory and practice*. Wiley-VCH, New York
28. Pawliszyn J (1999) *Applications of solid phase microextraction*. Royal Society of Chemistry Chromatography Monographs, Cambridge
29. Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J (2000) *J Chromatogr A* 880:35–62
30. De la Calle D, Reichenbacher M, Danzer K, Hurlbeck C, Bartsch C, Feller K-H (1997) *J High Resol Chromatogr* 20:665–668
31. De la Calle D, Reichenbacher M, Danzer K, Hurlbeck C, Bartsch C, Feller K-H (1998) *J High Resol Chromatogr* 21:373–377
32. Tat L, Comuzzo P, Stolfo I, Battistutta F (2005) *Food Chem* 93:361–369
33. Whiton RS, Zoeklein BW (2000) *Am J Enol Vitic* 51:379–382
34. Rocha S, Ramalheira B, Barros A, Delgado I, Coimbra MA (2001) *J Agric Food Chem* 49:5142–5151
35. Liu M, Zeng Z, Tian Y (2005) *Anal Chim Acta* 540:341–353
36. Vaz LMT, Costa AM, Relva AM (2001) *J Microcolumn Separ* 13:236–242
37. Francioli S, Guerra M, López-Tamames E, Guadayo JM, Caixach J (1999) *Am J Enol Vitic* 50:404–408
38. Favretto D, Grandis G, Allegri G, Traldi P (1998) *Rapid Commun Mass Spectrom* 12:1595–1600
39. De la Calle D, Reichenbacher M, Danzer K, Hurlbeck C, Bartsch C, Feller K-H (1998) *Fresenius J Anal Chem* 360:784–787
40. Weber J, Beeg M, Bartsch C, Feller K-H, De la Calle D, Reichenbacher M, Danzer K (1999) *J High Resol Chromatogr* 22:322–326
41. Vas G, Koteleky K, Farkas M, Dobó A, Vékey K (1998) *Am J Enol Vitic* 1:100–104
42. Pozo-Bayón MA, Pueyo E, Martín-Álvarez PJ, Polo MC (2001) *J Chromatogr A* 922:267–275
43. Demyttenaere JCR, Dagher C, Sandra P, Kallithraka S, Verhé R, De Kimpe N (2003) *J Chromatogr A* 985:233–246
44. Begala M, Corda L, Podda G, Fedrigo MA, Traldi P (2002) *Rapid Commun Mass Spectrom* 16:1086–1091
45. Bonino M, Schellino R, Rizzi C, Aigotti R, Baiocchi C (2003) *Food Chem* 80:125–133
46. Marengo E, Aceto M, Maurino V (2001) *J Chromatogr A* 943:123–137
47. Jurado JM, Ballesteros O, Alcázar A, Pablos F, Martín MJ, Vilchez JL, Navalón A (2008) *Anal Bioanal Chem* 390:961–970
48. Rocha SM, Coutinho P, Barros A, Delgado I, Coimbra MA (2006) *J Chromatogr A* 1114:188–197
49. Rodríguez-Bencomo JJ, Conde JE, Rodríguez-Delgado MA, García-Montelongo F, Pérez-Trujillo JP (2002) *J Chromatogr A* 963:213–223
50. Rodríguez-Bencomo JJ, Conde JE, García-Montelongo F, Pérez-Trujillo JP (2003) *J Chromatogr A* 991:13–22
51. Setkova L, Risticic S, Pawliszyn J (2007) *J Chromatogr A* 1147:224–240
52. Giraudel JL, Setkova L, Pawliszyn J, Montury M (2007) *J Chromatogr A* 1147:241–253
53. Riu-Aumatell M, Bosch-Fusté J, López-Tamames E, Buxaderas S (2006) *Food Chem* 95:237–242
54. Vianna E, Ebeler SE (2001) *J Agric Food Chem* 49:589–595
55. Mallouchos A, Komaitis M, Koutinas A, Kanellaki M (2002) *J Agric Food Chem* 50:3840–3848
56. Mallouchos A, Komaitis M, Koutinas A, Kanellaki M (2003) *J Agric Food Chem* 51:2402–2408
57. Flamini R, Dalla Vedova A, Panighel A, Perchiazzi N, Ongarato S (2005) *J Mass Spectrom* 40:1558–1564
58. Carrillo JD, Garrido-López A, Tena MT (2006) *J Chromatogr A* 1102:25–36
59. Lambropoulos I, Roussis IG (2007) *Food Res Int* 40:176–181
60. Diaz-Maroto MC, Sánchez-Palomo E, Pérez-Coello MS (2004) *J Agric Food Chem* 52:6857–6861
61. Carrillo JD, Tena MT (2006) *Anal Bioanal Chem* 385:937–943
62. Bozalongo R, Carrillo JD, Fernández MA, Tena MT (2007) *J Chromatogr A* 1173:10–17
63. Castro R, Natera R, Benitez P, Barroso CG (2004) *Anal Chim Acta* 513:141–150
64. Bohlscheid JC, Wang X-D, Mattinson DS, Edwards CG (2006) *J Food Qual* 29:1–15
65. Mestres M, Busto O, Guasch J (1998) *J Chromatogr A* 808:211–218
66. Mestres M, Sala C, Martí MP, Busto O, Guasch J (1999) *J Chromatogr A* 835:137–144
67. Mestres M, Martí MP, Busto O, Guasch J (1999) *J Chromatogr A* 849:293–297
68. Mestres M, Martí MP, Busto O, Guasch J (2000) *J Chromatogr A* 881:583–590
69. Mestres M, Busto O, Guasch J (2002) *J Chromatogr A* 945:211–219
70. Fang Y, Qian MC (2005) *J Chromatogr A* 1080:177–185
71. Fedrizzi B, Magno F, Badocco D, Nicolini G, Versini G (2007) *J Agric Food Chem* 55:10880–10887
72. López R, Lapeña AC, Cacho J, Ferreira V (2007) *J Chromatogr A* 1143:8–15
73. Martorell N, Martí MP, Mestres M, Busto O, Guasch J (2002) *J Chromatogr A* 975:349–354
74. Castro R, Natera R, Moreno MVG, Barroso CG (2003) *J Chromatogr A* 995:11–20
75. Sala C, Mestres M, Martí MP, Busto O, Guasch J (2000) *J Chromatogr A* 880:93–99
76. Sala C, Mestres M, Martí MP, Busto O, Guasch J (2002) *J Chromatogr A* 953:1–6
77. Chapman DM, Thornagat JH, Matthews MA, Guinard J-X, Ebeler SE (2004) *J Agric Food Chem* 52:5431–5435
78. Prouteau C, Schneider R, Lucchese Y, Nepveu F, Renard R, Vaca-García C (2004) *Anal Chim Acta* 513:223–227
79. Ryan D, Watkins P, Smith J, Allen M, Marriott P (2005) *J Sep Sci* 28:1075–1082
80. Evans TJ, Butzke CE, Ebeler SE (1997) *J Chromatogr A* 786:293–298
81. Alzaga R, Ortiz L, Sánchez-Baeza F, Marco MP, Bayona JM (2003) *J Agric Food Chem* 51:3509–3514
82. Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J (2002) *J Chromatogr A* 977:1–8
83. Jönsson S, Usitalo T, Van Bavel B, Gustafsson I-B, Lindström G (2006) *J Chromatogr A* 1111:71–75
84. Bianchi F, Careri M, Mangia A, Musci M (2003) *J Sep Sci* 26:369–375

85. Lizarraga E, Irigoyen A, Belsue V, González-Peñas E (2004) *J Chromatogr A* 1052:145–149
86. Martínez-Uruñuela A, González-Sáiz JM, Pizarro C (2004) *J Chromatogr A* 1056:49–56
87. Ezquerro O, Tena MT (2005) *J Chromatogr A* 1068:201–208
88. Insa S, Besalú E, Iglesias C, Salvadó V, Anticó E (2006) *J Agric Food Chem* 54:627–632
89. Martínez-Uruñuela A, González-Sáiz JM, Pizarro C (2004) *J Chromatogr A* 1048:141–151
90. Martínez-Uruñuela A, González-Sáiz JM, Pizarro C (2005) *J Chromatogr A* 1089:31–38
91. Pizarro C, Pérez-del-Notario N, González-Sáiz JM (2007) *J Chromatogr A* 1143:26–35
92. Insa S, Salvadó V, Anticó E (2004) *J Chromatogr A* 1047:15–20
93. Insa S, Besalú E, Salvadó V, Anticó E (2007) *J Sep Sci* 30:722–730
94. Vlachos P, Kampioti A, Kornaros M, Lyberatos G (2007) *Food Chem* 105:681–690
95. Pizarro C, Pérez-del-Notario N, González-Sáiz JM (2007) *J Chromatogr A* 1166:1–8
96. Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Beltrán R (2006) *J Chromatogr A* 1112:133–140
97. Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J (2006) *J Chromatogr A* 1107:240–247
98. Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J (2006) *Anal Chim Acta* 563:310–314
99. Boutou S, Chatonnet P (2007) *J Chromatogr A* 1141:1–9
100. Neto PV, Rocha SM, Silvestre AJD (2007) *J Sci Food Agric* 87:632–640
101. Peña RM, Barciela J, Herrero C, García-Martín S (2005) *J Sci Food Agric* 85:1227–1234
102. Peña RM, Barciela J, Herrero C, García-Martín S (2005) *Talanta* 67:129–135
103. Camara JS, Alves MA, Marques JC (2006) *Anal Chim Acta* 555:191–200
104. Camara JS, Alves MA, Marques JC (2007) *Food Chem* 101:475–484
105. Hayasaka Y, Bartowsky EJ (1999) *J Agric Food Chem* 47:612–617
106. Castro R, Natera R, Moreno MVG, Barroso CG (2002) *J Chromatogr A* 953:7–15
107. Natera R, Castro R, Moreno MVG, Rowe FG, Barroso CG (2002) *J Chromatogr A* 967:261–267
108. Pizarro C, Esteban-Díez I, Sáenz-González C, González-Sáiz JM (2008) *Anal Chim Acta* 608:38–47
109. Cocchi M, Durante C, Foca G, Manzini D, Marchetti A, Ulrici A (2004) *Chemom Intell Lab Syst* 71:129–140
110. Giordano L, Calabrese R, Davoli E, Rotilio D (2003) *J Chromatogr A* 1017:141–149
111. Ebeler SE, Terrien MB, Butzke CE (2000) *J Sci Food Agric* 80:625–630
112. Watts VA, Butzke CE (2003) *J Sci Food Agric* 83:1143–1149
113. Watts VA, Butzke CE, Boulton RB (2003) *J Agric Food Chem* 51:7738–7742
114. Rodrigues F, Caldeira M, Camara JS (2008) *Anal Chim Acta* 609:82–104
115. Bicchi C, D'Amato A, David F, Sandra P (1989) *J High Resolut Chromatogr* 12:316–321
116. Arthur CL, Pawliszyn J (1990) *Anal Chem* 62:2145–2148
117. Baltussen E, Janssen HG, Sandra P, Cramers CA (1997) *J High Resolut Chromatogr* 20:395–399
118. Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers CA (1999) *J Microcol Separ* 11:737–747
119. Sponholz WR, Hoffmann A, David F, Sandra P (2001) *Mitteilungen Klosterneuburg* 51:248–253
120. Hayasaka Y, MacNamara K, Baldock GA, Taylor RL, Pollnitz AP (2003) *Anal Bioanal Chem* 375:948–955
121. Zalacain A, Alonso GL, Lorenzo C, Iñiguez M, Salinas MR (2004) *J Chromatogr A* 1033:173–178
122. Lorenzo C, Zalacain A, Alonso GL, Salinas MR (2006) *J Chromatogr A* 1114:250–254
123. Tiepont B, David F, Bicchi C, Sandra P (2000) *J Microcol Separ* 12:577–584
124. Callejon RM, Troncoso AM, Morales ML (2007) *Talanta* 71:2091–2097
125. Marín J, Zalacain A, De Miguel C, Alonso GL, Salinas MR (2005) *J Chromatogr A* 1098:1–6
126. Zalacain A, Marín J, Alonso GL, Salinas MR (2007) *Talanta* 71:1610–1615
127. Fang Y, Quian MC (2006) *J Agric Food Chem* 54:8567–8573
128. Díez J, Domínguez C, Guillén DA, Veas R, Barroso CG (2004) *J Chromatogr A* 1025:263–267
129. Alves RF, Nascimento AMD, Nogueira JMF (2005) *Anal Chim Acta* 546:11–21
130. Komes D, Ulrich D, Lovric T, Schippel K (2005) *Vitis* 44:187–193
131. Kittel KM, Lavin EH, Deibler KD, Maillard A, Acree TE (2002) Abstracts of papers, 224th ACS national meeting
132. Kittel KM, Lavin EH, Deibler KD, Acree TE, Maillard A (2004) *Food Sci Tech* 131:455–462
133. Ochiai N, Sasamoto K, Takino M, Yamashita S, Daishima S, Heiden AC, Hoffmann A (2002) *Anal Bioanal Chem* 373:56–63
134. Pfannkoch E, Whitecavage J (2003) *LCGC North America*, pp 37–38
135. Durán Guerrero E, Natera Marín R, Castro Mejías R, Barroso CG (2006) *J Chromatogr A* 1104:47–53
136. Durán Guerrero E, Natera Marín R, Castro Mejías R, Barroso CG (2007) *J Chromatogr A* 1167:18–26
137. Salinas MR, Zalacain A, Pardo F, Alonso GL (2004) *J Agric Food Chem* 52:4821–4827
138. Luan F, Mosandl A, Gubesch M, Wüst M (2006) *J Chromatogr A* 1112:369–374
139. Caven-Quantrill DJ, Buglass AJ (2006) *J Chromatogr A* 1117:121–131
140. Christ I, Kuehn UB, Strassburger K (2007) Solid phase dynamic extraction: a technique for extracting more analytes from samples. In: Marsili R (ed) *Sensory-directed flavour analysis*. CRC Press LLC, Boca Raton, USA, pp 155–180
141. Bicchi C, Cordero C, Libertò E, Rubiolo P, Sgorbini B (2004) *J Chromatogr A* 1024:217–226
142. Musshoff F, Lachenmeier D, Kroener L, Madea B (2002) *J Chromatogr A* 958:231–238
143. Lachenmeier D, Kroener L, Musshoff F, Madea B (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:472–478
144. Lipinski J (2001) *Fresenius J Anal Chem* 369:57–62
145. Bicchi C, Iori C, Rubiolo P, Sandra P (2002) *J Agric Food Chem* 50:449–459
146. Musshoff F, Lachenmeier D, Kroener L, Madea B (2003) *Forensic Sci Int* 133:32–38
147. Jochmann MA, Kmiecik MP, Schmidt TC (2006) *J Chromatogr A* 1115:208–212



Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars

Enrique Durán Guerrero, Ramón Natera Marín, Remedios Castro Mejías*, Carmelo García Barroso

Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Cádiz, P.O. Box 40, E-11510, Pol. Río San Pedro, Puerto Real, Cádiz, Spain

Received 23 May 2005; received in revised form 21 November 2005; accepted 2 December 2005

Available online 27 December 2005

Abstract

Stir bar sorptive extraction (SBSE) was evaluated for analysing volatile compounds in vinegar. The extraction and desorption analytical conditions have been optimised using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. This chemometric tool is very appropriate in screening experiments where the aim is to investigate several possibly influential and/or interacting factors. For the extraction step, the optimum analytical conditions were: sample volume 25 ml without dilution, sampling time 120 min, NaCl content 5.85 g, and stirring speed 1250 rpm. For the desorption step, the optimised analytical conditions were: desorption temperature 300 °C, cryofocusing temperature –140 °C, flow of helium 75 ml min⁻¹, and desorption time 10 min. The SBSE procedure developed shows detection limits, and linear ranges adequate for analysing this type of compounds. The repeatability values obtained were lower than 10%.

SBSE is a very simple, solvent-free, fast technique with better sensitivities, in general, than SPME. However, a disadvantage of this technique is that, up to now, the stir bar offers a limited enrichment capability for polar compounds because is only available with PDMS coating.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Stir bar sorptive extraction; Vinegar; Volatile compounds; Two-level factorial design; Central composite design

1. Introduction

Vinegar is now a product of high reputation, much appreciated in gastronomy. Due to the diversity of vinegars on the market and the increase in demand, it has been considered necessary to investigate reliable analytical methods to establish criteria for determining quality and origin, since objective authentication remains an unresolved issue.

The market value of this type of product can only be sustained if chemical–physical and/or sensorial parameters are found to express differences in composition on the basis of the origin of the vinegar, manufacturing techniques and commercial type.

The flavour of vinegar depends on the raw materials (white and red wines, cider, malted barley, honey, etc.), the constituents formed during the fermentation and, in some cases, the substances formed during the ageing, so it is logical to suppose that vinegars may be characterised and differentiated by the quantitative and qualitative analysis of their volatile components.

Even today, the extraction and concentration of flavour components, prior to their GC analysis, constitute a problem that has still not been satisfactorily resolved. In recent years, there has been an increasing interest in developing new analytical techniques for the monitoring of volatile compounds in a wide variety of matrices. In the bibliography, various methods can be found for the capillary GC analysis of volatile components [1–5]. The tendency is to develop accurate, easy-to-automate, and sensitive methodologies which reduce sample handling. Sample preparation for GC analysis of less volatile compounds has been carried out mainly by liquid/liquid [1] or solid phase [2] extraction. The more volatile compounds are normally analysed by head space or by purge and trap methods [3,6]. Other preparation techniques employed include supercritical fluid extraction [7], and simultaneous distillation-solvent extraction [8], among others. All these sample preparation methods present several disadvantages, such as excessive cost and time, the possible generation of artefacts, etc.

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a recently developed technique [9–12] in which a stir bar coated with 50–300 µl of polydimethylsiloxane (PDMS) is employed to extract analytes from a variety of matrices. The extraction mechanism is similar

* Corresponding author. Tel.: +34 56 01 63 63; fax: +34 56 01 64 60.
E-mail address: remedios.castro@uca.es (R.C. Mejías).

to that of solid phase microextraction (SPME) based on PDMS sorption [13]. A magnetic stirring bar is added to the sample to promote the transfer of analytes to the polymer coating and, after a predetermined extraction period, the analytes are thermally desorbed in the GC injector.

The advantage of SBSE is the much higher mass of PDMS available, which results in high recoveries and higher sample capacity. The applications developed with SBSE have shown low detection limits and good repeatability [12,14,15], which confirm the great potential of this technique.

The present paper describes the optimisation of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption procedure coupled to capillary gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in vinegar.

The parameters that affect the extraction of the analytes from vinegar into the into PDMS coated stir bars and the conditions affecting thermal desorption are investigated using a chemometric approach based on the use of an optimum set of experiments (experimental design) which allows the simultaneous variation of all experimental factors studied, and the distinguishing of interactions among them that are not detectable with the classical experimental methods [16,17]. For the extraction step, we evaluate the effects of experimental parameters such as sample volume, salting out effect, stirring speed, sampling time, and dilution of the sample on the SBSE. For the desorption into the GC, the factors evaluated were desorption temperature, desorption time, helium flow, and cryofocusing temperature in the PTV injector. In both cases, the effects of these parameters were evaluated using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. This chemometric tool is very appropriate in screening experiments where the aim is to investigate possibly influential and/or interacting factors. The juxtaposition of a two-level design with a star design (the centres of the two designs coincide) gives a composite design. It is one of the most useful designs for estimating a multi-factor response surface [16,17], which keeps to a minimum the number of experiments while providing the information needed.

2. Experimental

2.1. Vinegar samples

A Commercial Sherry vinegar sample was used to optimise the extraction and desorption conditions in order to determine various vinegar aroma and flavour compounds of varying volatilities and functionalities. After optimisation, several vinegars were analysed following this methodology.

2.2. Chemicals and reagents

All the aroma standards used in this study were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma (Steinheim, Germany). 4-Methyl-2-pentanol was employed as internal standard. NaCl was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

2.3. Sample preparation

The extractions were carried out with 10 mm × 0.5 mm (length × film thickness) PDMS commercial stir bars, supplied by Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany). After optimisation, and for each SBSE analysis, a volume of 25 ml of sample (natural and synthetic vinegar) was pipetted and placed into a 100-ml Erlenmeyer flask with 5.85 g of NaCl and 50 µl of a solution of 4-methyl-2-pentanol (2.27 g/l in Milli-Q water containing 80 g/l of acetic acid). The Erlenmeyer flask was placed on a 15 position magnetic stirrer (Mülheim a/d Ruhr, Germany). The stir bar was stirred at 1250 rpm at 25 °C for 120 min. After removal from the vinegar sample, the stir bar was placed for a few seconds in distilled water in order to remove NaCl and gently dried with a lint-free tissue. Then, it was transferred into a glass thermal desorption tube and then thermal desorption was carried out.

2.4. Apparatus

The coated stir bars were thermally desorbed using a commercial TDS-2 thermal desorption unit (Gerstel) connected to a programmed-temperature vapourisation (PTV) injector CIS-4 (Gerstel) by a heated transfer line. The PTV was installed in an Agilent 6890 GC-5973 MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). An empty baffled liner was used in the PTV. The thermodesorption unit was equipped with a MPS 2L autosampler (Gerstel) capable of handling the program for 98 coated stir bars. The desorption temperature was programmed from 40 to 300 °C (held for 10 min) at 60 °C min⁻¹ under a helium flow (75 ml min⁻¹) and the desorbed analytes were cryofocused in the PTV system with liquid nitrogen at -140 °C. Finally, the PTV system was programmed from -140 to 300 °C (held for 5 min) at 10 °C s⁻¹ for analysis by GC-MS. Capillary GC-MS analyses in the electron impact mode were performed on an Agilent 6890 GC-5973N MS system (Agilent, Little Falls, DE, USA), equipped with a DB-Wax capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 60 m × 0.25 mm I.D., with a 0.25 µm coating. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹. The GC oven was programmed as follows: held at 35 °C for 10 min, then ramped at 5 °C min⁻¹ to 100 °C. Then it was raised to 210 °C at 3 °C min⁻¹ and held for 40 min. The mass detector operated in EI+ mode at 70 eV in a range of 30–400 amu.

Peak identification was carried out using the Wiley library by analogy of mass spectra and confirmed by retention indices of standards when they were available or by retention data from the literature. Quantitative data from the identified compounds were obtained by measuring the molecular ion relative peak area in relation to that of 4-methyl-2-pentanol, the internal standard.

2.5. Experimental design

The standard approach to the analysis of the experimental design data is to calculate and evaluate a list of the main effects and interaction effects supported by an ANOVA table, indicating which effects are significant. For data manipulation, the Statgraphics Statistical Computer Package “Statgraphics Plus 5.0” for Windows 98 was used.

Table 1
Factor levels

Factor	Low (–)	High (+)	Centre	Axial (– α)	Axial (+ α)
Sample volume (ml)	20	40			
Stirring speed (rpm)	500	1500	1000	190	1800
Extraction time (min)	30	120	75	2.5	147
NaCl (M)	2.0	4.0	3.0	1.4	4.6
Dilution	0.0	1.0	0.5	0.0	1.3

Optimisation of extraction conditions.

In this study, we chose a sequential exploration of the response, which was carried out in two stages. In the first stage, we wished to establish the relative influence of the factors and their interactions on the number of chromatographic peaks detected and on the total chromatographic area obtained. Five factors were selected as potentially affecting the SBSE extraction: time of extraction, sample volume, stirring speed, ionic strength effect from adding different amounts of NaCl, and dilution of the sample.

This last factor was considered taking into account that the presence of sample matrix can change not only the distribution coefficient, but also the equilibrium time in sorptive extraction [13]. In wines, the ethanol content appears to interfere in the SPME technique [18–20]. Since acetic acid is one of the major constituents of vinegars, it may compete with the volatile compounds in the extraction. In a previous study [4], using SPME, the data obtained showed that although the absolute chromatographic areas decreased as the acetic acid content increased, the compound area/I.S. area ratio remained constant, so the acetic acid concentration did not affect the analytical data. On the other hand, analyses are greatly simplified when samples can be generously diluted, by preventing overloaded peaks and detector saturation, but high sensitivity detection methods are required.

Consequently, a factorial design of 2^{5-1} was chosen. This design involves 16 experiments undertaken in random order to provide protection against the effects of lurking variables. These experiments were carried out in triplicate. The values corresponding to the high (+), and low (–) points for each factor are shown in Table 1.

In the second stage, this two-level factorial design was expanded to a star design. A central composite design (CCD, with $\alpha = 1.607$) was obtained, since the centres of the two separate designs were coincidental. Table 1 lists the values given to each factor.

Then, the desorption conditions were also optimised following a similar process (factorial design of 2^4 , and then, a central composite design with $\alpha = 1.078$). In this case, four factors

were selected: desorption temperature and time, helium flow and cryofocusing temperature. Table 2 lists the values given to each factor.

3. Results and discussion

3.1. Extraction condition optimisation

Time of extraction, sample volume, stirring speed, dilution of the sample, and the ionic strength effect from adding different amounts of NaCl were evaluated to achieve the best overall analytical conditions. Number of chromatographic peaks and total chromatographic area were selected as experimental responses for optimising.

3.1.1. Screening by a 2^{5-1} factorial design

The initial screening design served to detect those variables having the most influence on the experimental responses (number of chromatographic peaks and total chromatographic area).

The data obtained for these parameters were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results can be shown by bar charts (Fig. 1). In these graphics, the data are presented in chart form with the causes depicted in rank order.

Extraction time, stirring speed, NaCl concentration, and dilution were significant parameters (at $p < 0.05$) for both number of chromatographic peaks and total area. Sample volume was only significant, with a modest effect, for total area.

Extraction time was the most influential variable for total area and number of peaks. All significant factors affected both responses with a positive sign with the exception of dilution of the sample, which, as can be expected, affected them with a negative sign.

The SBSE efficiency is also affected by the interrelated variables, as shown in Fig. 1. The interaction between the factors extraction time and stirring speed appears statistically significant, with a positive sign, for both the number of peaks detected and the total area. For this latter experimental response, the inter-

Table 2
Factor levels

Factor	Low (–)	High (+)	Centre	Axial (– α)	Axial (+ α)
Desorption temperature (°C)	250	330	290	247	333
Desorption time (min)	4	12			
Helium flow (ml min ⁻¹)	50	150			
Cryofocusing temperature (°C)	–150	–10	–80	–155.5	–4.5

Optimisation of desorption conditions.

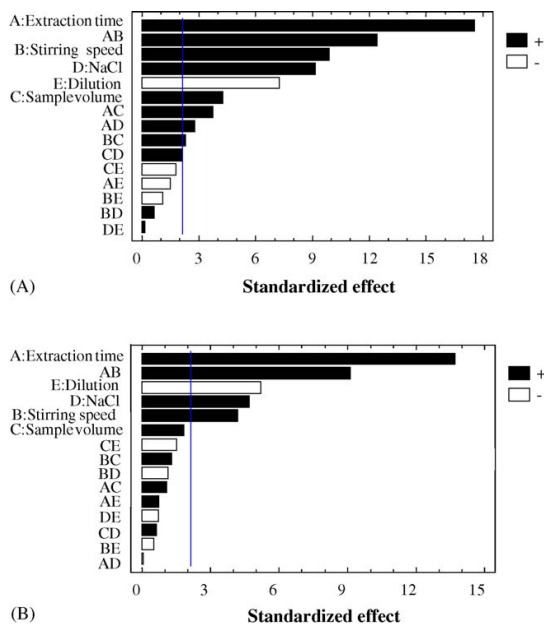


Fig. 1. Pareto chart of main effects in the factorial 2^{5-1} design for total area (A) and chromatographic peak number (B). Optimisation of extraction conditions.

actions between extraction time and sample volume and NaCl were also significant.

3.1.2. Optimisation by a central composite design

As can be seen, the SBSE technique is affected by interrelated parameters. For an optimisation design, it is advisable to keep the number of parameters as small as possible in order to avoid very complex response models and large variability. Since sample volume was not shown to have a statistically significant influence on the considered responses (total chromatographic area and number of chromatographic peaks), in order to estimate curvature in response surfaces, we decided not to retain this factor. For the central composite design (CCD), the four parameters utilised were: extraction time, stirring speed, NaCl, and dilution of the sample. The sample volume was set at 25 ml. The axial values for these parameters are located on a sphere surrounding the two-level factorial design (Table 1).

After the CCD, as expected from the screening experiments, the extraction time appeared as statistically significant main effect, having a strong positive influence for both total area and number of chromatographic peaks (Table 3).

Stirring speed and NaCl showed a significant and positive influence on both experimental responses whilst dilution of the sample was statistically negative for them. In general, no problems of overloaded peaks and detector saturation were observed when the sample was injected without dilution.

For both experimental responses, among the two factor interactions, the extraction time and stirring speed interaction was the most statistically significant.

Table 3

Main effects and interactions in the central composite design for number of chromatographic peaks and total area

Effect	Number of chromatographic peaks		Total area	
	F ratio	p-value	F ratio	p-value
A: Extraction time	100.98	0.0000 ^a	48.29	0.0000 ^a
B: Stirring speed	15.36	0.0004 ^a	20.19	0.0001 ^a
C: NaCl	7.46	0.0099 ^a	17.39	0.0002 ^a
D: Dilution	14.44	0.0006 ^a	7.01	0.0122 ^a
AA	30.80	0.0000 ^a	23.08	0.0000 ^a
AB	22.89	0.0000 ^a	15.08	0.0005 ^a
AC	0.37	0.5495	2.26	0.1416
AD	1.07	0.3074	3.53	0.0688
BB	40.02	0.0000 ^a	49.35	0.0000 ^a
BC	1.00	0.3235	0.44	0.5125
BD	1.96	0.1709	0.28	0.5972
CC	0.80	0.3780	0.02	0.8907
CD	4.96	0.0326 ^a	5.45	0.0257 ^a
DD	2.78	0.1044	9.26	0.0045 ^a

Optimisation of extraction conditions.

^a Values are significant at $p < 0.05$.

Fig. 2 shows the response surface plots for the total area and the number of chromatographic peaks obtained by plotting extraction time versus stirring speed. Intensive stirring is known to shorten the extraction time. At high extraction

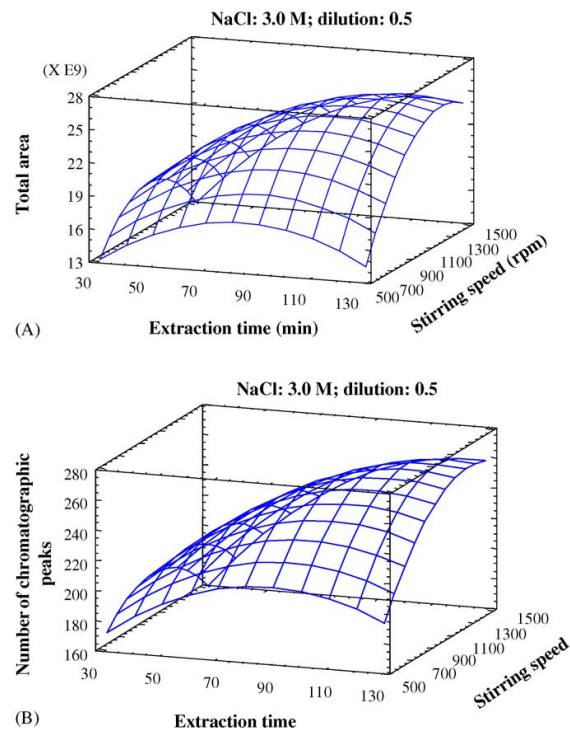


Fig. 2. Estimated response surfaces for total chromatographic area (A) and number of chromatographic peaks (B) using the central composite design obtained by plotting extraction time vs. stirring speed. Optimisation of extraction conditions.

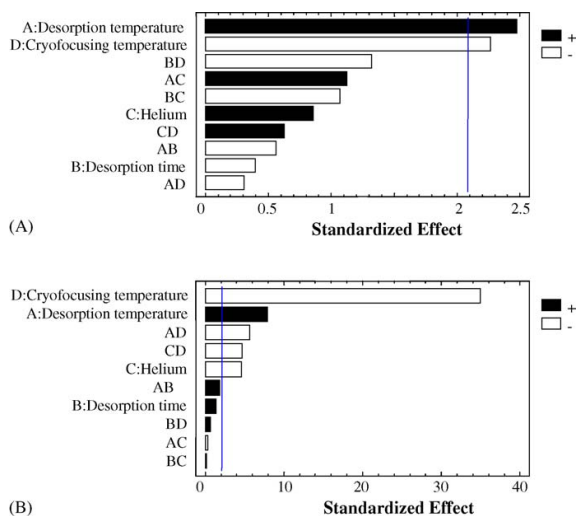


Fig. 3. Pareto chart of main effects in the factorial 2^4 design for total area (A) and chromatographic peak number (B). Optimisation of desorption conditions.

time (130 min), better experimental responses were obtained in line with increasing stirring speed. This interaction indicates that a long sampling time produces the extraction of a larger number of volatile compounds when high stirring speed is used.

In summary, after evaluation of the main factors and their interactions, the best conditions for extracting the volatile compounds of vinegar were: sample volume 25 ml without dilution, sampling time 120 min, NaCl content 5.85 g, and stirring speed 1250 rpm.

3.2. Desorption condition optimisation

Desorption time and temperature, helium flow, and cryofocusing temperature were evaluated to achieve the best overall analytical conditions. Number of chromatographic peaks and total chromatographic area were selected as experimental responses for optimising.

3.2.1. Screening by a 2^4 factorial design

The data obtained for these parameters were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results can be shown by bar charts (Fig. 3).

Desorption temperature, with positive sign, and cryofocusing temperature, with negative sign, were significant (at $p < 0.05$) for total area and number of chromatographic peaks. Flow of helium was only significant for, with a modest effect, the number of chromatographic peaks.

Desorption time was insignificant for both experimental responses.

In this case, the two-factor interactions were insignificant for total area and had a very modest effect for number of chromatographic peaks.

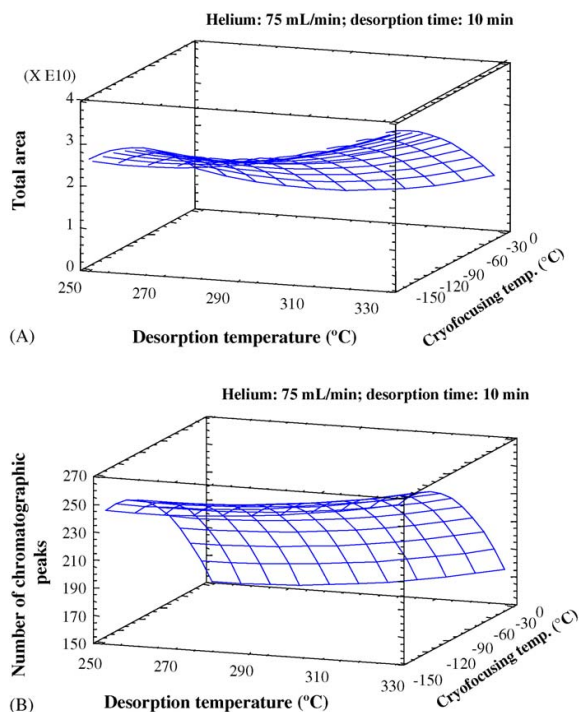


Fig. 4. Estimated response surfaces for total chromatographic area (A) and number of chromatographic peaks (B) using the central composite design obtained by plotting desorption temperature vs. cryofocusing temperature. Optimisation of desorption conditions.

3.2.2. Optimisation by a central composite design

Taking into account these results and that is advisable to keep the number of parameters as small as possible, we decided not to retain desorption time and flow of helium for this statistical study. They were set at 10 min for desorption time and 75 ml min^{-1} for helium flow, respectively.

For the central composite design (CCD), the two parameters utilised were: desorption and cryofocusing temperatures. The axial values for these parameters are located on a sphere surrounding the two-level factorial design (Table 2).

After the CCD, as expected from the screening experiments, both factors were significant for total area and number of chromatographic peaks. Desorption temperature and cryofocusing temperature interaction was only significant for total area.

Fig. 4 shows the response surface plot for the total area obtained by plotting desorption temperature versus cryofocusing temperature. At high desorption temperature (330°C), better experimental response was obtained in line with decreasing cryofocusing temperature.

This interaction indicates that a low cryofocusing temperature produces the desorption into the GC of a larger number of volatile compounds when a high desorption temperature is used.

In summary, after evaluation of the main factors and their interactions, the optimum conditions for the desorption of volatile compounds of vinegar were: desorption temperature 330°C , cryofocusing temperature -140°C , flow of helium

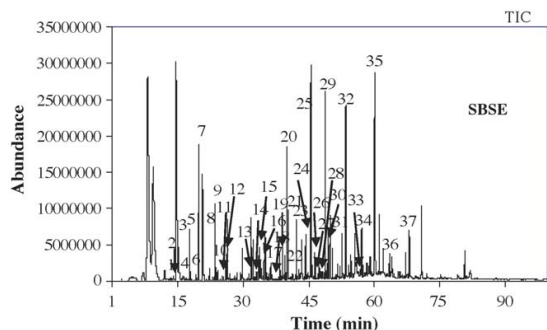


Fig. 5. Total ion chromatogram obtained for a vinegar sample by means of SBSE. 1, ethyl isobutyrate; 2, propyl acetate; 3, isobutyl acetate; 4, ethyl butyrate; 5, ethyl pentanoate; 6, 2-methyl-1-propanol; 7, isoamyl acetate; 8, ethyl hexanoate; 9, 2-methyl-1-butanol; 10, isoamyl alcohol; 11, hexyl acetate; 12, 3-hydroxy-2-butanone; 13, ethyl octanoate; 14, 2-furancarboxaldehyde; 15, decanal; 16, benzaldehyde; 17, isobutyric acid; 18, 5-methyl-2-furfural; 19, butyric acid; 20, isovaleric acid; 21, diethyl succinate; 22, α -terpineol; 23, benzyl acetate; 24, ethyl-2-phenyl acetate; 25, phenylethyl acetate; 26, hexanoic acid; 27, α -ionona; 28, benzyl alcohol; 29, 2-phenylethanol; 30, 2-ethyl-hexanoic acid; 31, 4-ethylguaiaicol; 32, octanoic acid; 33, eugenol; 34, 4-ethylphenol; 35, decanoic acid; 36, diethyl phthalate; 37, lauric acid.

75 ml min⁻¹, and desorption time 10 min. Taking into account the specifications from the manufacturer, the desorption temperature was finally set at 300 °C in order not to damage the stir bar.

3.3. SPME and SBSE comparative study

This analytical method was used to analyse a variety of Sherry vinegar samples supplied by different producers. Each sample was analysed in triplicate.

The chromatograms obtained using SPME and SBSE for one of the vinegar samples are shown in Figs. 5 and 6. As can be seen, SBSE exhibits better sensitivities than SPME for most of the volatile compounds. However, some of these compounds, such as acetic acid, 2,3-butanediol, ethyl decanoate, 1,1,6 trimethyl-1,2-dihydro-naphtalene, and *n*-butyl acetate, could not be identified by SBSE. This fact can be explained on the basis of the

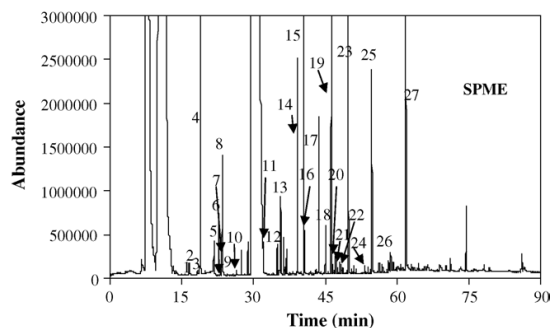


Fig. 6. Total ion chromatogram obtained for a vinegar sample by means of SPME. 1, *n*-butyl acetate; 2, ethyl pentanoate; 3, 2-methyl-1-propanol; 4, isoamyl acetate; 5, 4-methyl-2-pentanol (I.S.); 6, ethyl hexanoate; 7, 2-methyl-1-butanol; 8, isoamyl alcohol; 9, hexyl acetate; 10, 3-hydroxy-2-butanone; 11, 2-furancarboxaldehyde; 12, benzaldehyde; 13, 2,3-butanediol; 14, ethyl decanoate; 15, isovaleric acid; 16, diethyl succinate; 17, 1,1,6 trimethyl-1,2-dihydro-naphtalene; 18, ethyl-2-phenyl acetate; 19, phenylethyl acetate; 20, hexanoic acid; 21, α -ionona; 22, benzyl alcohol; 23, 2-phenylethanol; 24, 4-ethylguaiaicol; 25, octanoic acid; 26, 4-ethylphenol; 27, decanoic acid.

polarity of the PDMS stir bar, which offers a limited extraction capability for polar volatiles.

Some volatiles, for example ethyl isobutyrate, propyl acetate, ethyl butyrate, ethyl octanoate, decanal, isobutyric acid, 5-methyl-2-furfural, butyric acid, α -terpineol, benzyl acetate, eugenol, etc. could only be identified by SBSE.

3.4. Performance characteristics

3.4.1. Calibration

3.4.1.1. Linearity. In order to estimate the detection limits for a few relevant compounds, five levels of concentration were tested in triplicate; these concentrations covered the concentration ranges expected for these compounds in vinegars.

The [volatile compound/internal standard] molecular ion peak area ratio for the studied volatile compounds was used. The range of linearity studied for each compound appears in Table 4. The correlation coefficients were good ($r^2 > 0.99$).

Table 4
Linearity, detection limits, and repeatability for some volatile compounds

Compound	Linear range ($\mu\text{g/l}$)	Regression coefficient	Intercept \pm SD	Slope \pm SD	LOD ($\mu\text{g/l}$)	Repeat (RSD, %)
Ethyl isobutyrate	13.13–1093.75	0.9992	0.0248 \pm 0.0110	0.0030 \pm 0.0000	3.31	5.39
Ethyl butyrate	2.35–141.06	0.9956	0.0322 \pm 0.0048	0.0035 \pm 0.0001	0.71	5.27
Isoamyl alcohol ^a	0.48–100.00	0.9919	0.0133 \pm 0.0042	$2 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	0.22	2.88
3-Hydroxy-2-butanone ^a	3.38–2706.24	0.9973	0.0436 \pm 0.0023	$7 \times 10^{-7} \pm 2 \times 10^{-8}$	2.20	9.49
Hexan-1-ol	22.65–566.25	0.9986	0.0007 \pm 0.0017	0.0041 \pm 0.0000	8.60	3.45
Ethyl hexanoate	0.15–153.50	0.9983	0.0154 \pm 0.0045	0.0083 \pm 0.0001	0.05	4.88
Benzaldehyde	1.96–196.00	0.9988	0.0061 \pm 0.0004	0.0005 \pm 0.0000	0.52	4.18
Isobutyric acid ^a	2.43–121.26	0.9953	0.0107 \pm 0.0179	$1 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	0.89	5.04
5-Methyl-2-Furaldehyde	9.02–2310.00	0.9944	0.0170 \pm 0.0042	0.0002 \pm 0.0000	4.51	6.41
α -Terpineol	0.67–66.84	0.9983	-0.0077 \pm 0.0036	0.0109 \pm 0.0001	0.35	8.76
Octanoic acid ^a	0.06–6.41	0.9990	0.0788 \pm 0.0106	0.0004 \pm 0.0000	0.03	9.80
Eugenol	1.41–236.60	0.9980	-0.0217 \pm 0.0171	0.0145 \pm 0.0002	0.35	4.57

^a mg/l.

3.4.2. Detection limits and repeatability

Detection limits were calculated from the calibration curves constructed for each volatile compound, using the Alamin Computer Program [21].

The limits of detection (three times the relative standard deviation of the analytical blank values calculate from the calibration curve) obtained (Table 4) are low enough to determine these compounds in real vinegar samples, taking into account the concentrations found for them from the bibliography [22,23].

The repeatability has been evaluated by means of a series of five extractions of a Commercial Sherry wine vinegar. The mean concentrations for the studied volatile compounds, with their relative standard deviation (RSD) were calculated (Table 4). The RSD obtained ranges between 2.88–9.80%. These results corroborate the high reproducibility of this technique.

4. Conclusions

The conditions for the analysis of volatile compounds in vinegars using SBSE-TD-GC-MS have been optimised by means of a statistical approach. The detection limits and the repeatability values obtained for the studied volatile compounds are adequate for their quantitation in vinegars.

This method can be considered as an alternative to other analytical methods, such as SPME. It is a very simple, solvent-free, fast technique with better sensitivities, in general, than SPME. SPME presents some advantages with respect to SBSE, in particular because, to date, the stir bar offers a limited enrichment capability of polar compounds since it is only available with PDMS coating.

References

- [1] A. Rapp, H. Hastrich, L. Engel, *Vitis* 15 (1976) 29.
- [2] C.G. Edwards, R.B. Beelman, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 216.
- [3] A.C. Noble, R.A. Flath, R.R. Forrey, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 346.
- [4] R. Castro, R. Natera, M.V.G. Moreno, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 7.
- [5] R. Natera, R. Castro, M.V. García-Moreno, C.G. Barroso, F. García Rowe, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 261.
- [6] J.L. Wang, W.L. Chen, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 143.
- [7] G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1251.
- [8] G.P. Blanch, G. Reglero, M. Herraiz, J. Tabera, *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 11.
- [9] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [10] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [11] M.S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Water Res.* 38 (2004) 1679.
- [12] S. Nakamura, S. Daishima, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 291.
- [13] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction-theory and Practice*, Wiley, New York, 1997.
- [14] P. Popp, C. Bauer, B. Hauser, P. Keil, L. Wennrich, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 961.
- [15] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- [16] E. Morgan, *Chemometrics: Experimental Design*, Wiley, Chichester, 1991, pp. 197–256.
- [17] R.G. Brereton, *Chemometric: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems*, Ellis Horwood, Chichester, 1990.
- [18] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 293.
- [19] C. Fisher, U. Fisher, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1995.
- [20] R.S. Whiton, B.W. Zoecklein, *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (2000) 379.
- [21] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J.L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [22] V. Gerbi, G. Zeppa, A. Carnacini, *J. Food Sci.* 4 (1992) 259.
- [23] G. Blanch, J. Tabera, J. Sanz, M. Herraiz, G. Roglero, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1046.

Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: Validation study and comparison with solid phase microextraction

Enrique Durán Guerrero, Ramón Natera Marín,
Remedios Castro Mejías*, Carmelo García Barroso

Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Cádiz, P.O. Box 40, E-11510 Pol. Río San Pedro, Puerto Real, Cádiz, Spain

Received 24 April 2007; received in revised form 27 July 2007; accepted 16 August 2007

Available online 21 August 2007

Abstract

Stir bar sorptive extraction was evaluated for analysing volatiles in vinegar. The procedure developed shows detection and quantitation limits, and linear ranges adequate for analysing this type of compounds. The accuracy obtained was close to 100%, with repeatability values lower than 13%. The extraction efficiency is inversely affected by the acetic acid content. Although the absolute areas decrease, the compound area/internal standard area ratio remains constant, so for quantitative analysis, the acetic acid concentration does not affect the analytical data. The method was compared with a previous SPME method. Similar performance characteristics were obtained for both methodologies, with lower detection and quantitation limits and better repeatability reproducibility values for SBSE. Both analytical methods were used to analyse a variety of vinegars. The results obtained from both methods were in agreement.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Stir bar sorptive extraction; Vinegar; Aroma compounds; Validation; Solid phase microextraction

1. Introduction

Vinegar is used not only as condiment but also as ingredient in many food products, particularly sauces and dressings. Several types of vinegars produced from different raw materials and by different production processes can be found in the market. Sherry wine vinegar, produced from sherry wines following traditional method of acetification [1], is a wine-derived product of high reputation, very appreciated in gastronomy. Due to the diversity of vinegars in the market and the increase in demand, it has been considered necessary to investigate reliable analytical methods to establish criteria for determining quality and origin, since objective authentication remains an unresolved issue. Vinegar quality is heavily influenced by flavour compounds. Several hundred of compounds from different families contribute to vinegar flavour. Its chemical and organoleptic properties are determined by the acetification system, the raw material used as substrate and, in some cases, by the wood aging.

The different raw materials and technological procedures that can be used result in a great variety of products of diverse quality and organoleptic properties. Considering that the volatile constituents of any specific vinegar will be determined by these factors, raw material and technological process, it is logical to suppose that they could be characterised and differentiated by the quantitative and qualitative analysis of this type of compounds.

There are various methods for the capillary GC analysis of volatile components [2–4].

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a recently developed technique [5–8] in which a stir bar coated with 50–300 μL of polydimethylsiloxane (PDMS) is employed to extract analytes from a variety of matrices. The extraction mechanism is similar to that of solid phase microextraction (SPME) based on PDMS sorption [9]. A magnetic stirring bar is added to the sample to promote the transfer of analytes to the polymer coating and, after a predetermined extraction period, the analytes are thermally desorbed in the GC injector.

The advantage of SBSE is the much higher mass of PDMS available, which results in high recoveries and a higher sample capacity. The applications developed with SBSE have shown low detection limits and good repeatability [8,10–19], which confirm the great potential of this technique.

* Corresponding author. Tel.: +34 56 01 63 63; fax: +34 56 01 64 60.
E-mail address: remedios.castro@uca.es (R.C. Mejías).

In a previous paper [8], the optimisation of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption procedure coupled to capillary gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in vinegar was carried out.

For the extraction step, we evaluated the effects of experimental parameters such as sample volume, salting out effect, stirring speed, sampling time and dilution of the sample on the SBSE. For the thermal desorption into the GC, the factors evaluated were desorption temperature, desorption time, helium flow and cryofocusing temperature in the PTV injector. In both cases, the effects of these parameters were evaluated using a two-level factorial design expanded further to a central composite design.

The purpose of the work reported here is to perform the validation of the optimized SBSE analytical method, as well as to compare it with a previous methodology based on SPME technique [9]. The method, after validation, has been applied to various different samples of commercial vinegars.

2. Experimental

2.1. Vinegar samples

A commercial sherry vinegar sample was used to validate the analytical method for determining the various aroma and flavour compounds of varying volatilities and functions in vinegar. This methodology had been optimized in a previous study [8].

After validation, several vinegars from different raw materials were analyzed.

The comparative study was carried out using different commercial vinegar samples.

2.2. Chemicals and reagents

All the aroma standards used in this study were supplied by Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma (Steinheim, Germany).

Individual stock standard solutions of each aroma compound were prepared by weight in ethanol. A global stock standard solution containing all the analytes was prepared in a synthetic vinegar solution (2 g L⁻¹ of tartaric acid, 80 g L⁻¹ of acetic acid, 1 g L⁻¹ ethyl acetate, and 10 mL L⁻¹ of ethanol, in Milli-Q water). Working solutions used in order to determine the performance characteristics of the SBSE methodology were prepared by diluting different amounts of the global standard solution in a synthetic vinegar solution.

All these solutions were stored at 4 °C.

4-Methyl-2-pentanol was employed as internal standard. NaCl was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

2.3. SPME

2.3.1. Sample preparation

For each SPME analysis, a volume of 15 mL of vinegar was pipetted and placed into a 50-mL glass vial with 6.14 g of NaCl. Each sample was spiked with 50 µL of a solution of 4-methyl-2-pentanol (2.27 g L⁻¹ in Milli-Q water containing 80 g L⁻¹ of acetic acid). A small magnetic stirring bar was also added. The vial was tightly capped with a PTFE-faced silicone sep-

tum. The vial was placed in a thermostated block on a stirrer. The sample was equilibrated for 5 min at sampling temperature and, after this, the SPME fibre (carboxen-polydimethylsiloxane, CAR-PDMS; 75 µm) was inserted into the headspace. During the sampling time, the sample was stirred at constant speed. After completion of sampling, the fibre was removed from the sample vial and inserted into the injection port of the GC.

2.3.2. Chromatographic conditions

The samples were analysed using a GC 8000 chromatograph with a FID detector (Fisons Instruments, Milan, Italy).

The injection was made in the splitless mode for 2 min. For analytes desorption inside the GC injection port, the temperature was 280 °C. The GC was equipped with a DB-Wax capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 60 m × 0.25 mm I.D., with a 0.25 µm coating. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.1 mL min⁻¹. The detector temperature was 250 °C. The GC oven was programmed as follows: held at 35 °C for 10 min, then ramped at 5 °C min⁻¹ to 100 °C. Then it was raised to 210 °C at 3 °C min⁻¹ and held for 40 min.

The compounds were identified by mass spectrometric analysis. In these analyses, the same GC, under the same analytical conditions mentioned before, coupled to a MD 800 mass detector (Fisons Instruments, Milan, Italy) was used. The mass detector operated in EI+ mode at 70 eV in a range of 30 to 450 amu.

The signal was recorded and processed with Masslab software supplied with the Wiley 6.0 MS library. Peak identification was carried out by analogy of mass spectra and confirmed by retention indices of standards when they were available or by retention data from the literature. Quantitative data from the identified compounds were obtained by measuring the relative peak area in relation to that of 4-methyl-2-pentanol, the internal standard.

2.4. SBSE

2.4.1. Sample preparation

The extractions were carried out with 10 mm × 0.5 mm (length × film thickness) PDMS commercial stir bars, supplied by Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany). After optimisation, and for each SBSE analysis, a volume of 25 mL of sample (natural and synthetic vinegar) was pipetted and placed into a 100-mL Erlenmeyer flask with 5.85 g of NaCl and 50 µL of a solution of 4-methyl-2-pentanol (2.27 g L⁻¹ in Milli-Q water containing 80 g L⁻¹ of acetic acid). The Erlenmeyer flask was placed on a magnetic stirrer equipped with 15 positions (Mülheim a/d Ruhr, Germany). The stir bar was stirred at 1250 rpm at 25 °C for 120 min. After removal from the vinegar sample, the stir bar was placed for a few seconds in distilled water in order to remove NaCl and gently dried with a lint-free tissue. Then, it was transferred into a glass thermal desorption tube and then thermal desorption was carried out.

2.4.2. Apparatus

The coated stir bars were thermally desorbed using a commercial TDU thermal desorption unit (Gerstel) connected to a programmed-temperature vaporisation (PTV) injector CIS-4

(Gerstel) by a heated transfer line. The PTV was installed in an Agilent 6890 GC-5973 MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). An empty baffled liner was used in the PTV. The thermodesorption unit was equipped with a MPS 2 L autosampler (Gerstel) capable of handling the program for 98 coated stir bars. The desorption temperature was programmed from 40 to 300 °C (held for 10 min) at 60 °C min⁻¹ under a helium flow (75 mL min⁻¹) and the desorbed analytes were cryofocused in the PTV system with liquid nitrogen at -140 °C. Finally, the PTV system was programmed from -140 to 300 °C (held for 5 min) at 10 °C s⁻¹ for analysis by GC-MS. Capillary GC-MS analyses in the electron impact mode were performed on an Agilent 6890 GC-5973N MS system (Agilent, Little Falls, DE, USA), equipped with a DB-Wax capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 60 m × 0.25 mm I.D., with a 0.25 μm coating.

2.4.3. Chromatographic conditions

For SBSE, GC analytical conditions were the same as described above. Peak identification was also carried out using the Wiley library. In this case, quantitative data from the identified compounds were obtained by measuring the molecular ion peak area in relation to that of 4-methyl-2-pentanol, the internal standard.

3. Results and discussion

A higher number of volatile compounds were detected in the samples studied by means of SBSE. By SBSE, 47 volatile compounds could be identified whereas by SPME, only 25 were found. Most of these compounds found by SBSE and not by SPME are furanic compounds.

3.1. Performance characteristics

In a previous work [8], the calibration curves for a few relevant compounds were developed in order to estimate the detection limits and repeatability of each one. In the present work, the number of compounds studied have been extended to 47 and a complete validation study has been carried out, studying calibration and linearity, detection and quantitation limits, accuracy, repeatability, reproducibility and the possible matrix effect of the acetic acid content. Fig. 1 shows a typical chromatogram of a sherry wine vinegar obtained by means of SBSE.

3.1.1. Calibration. Linearity

Five levels of concentration were tested in triplicate; these concentrations covered the concentration ranges expected for the various aromatic compounds in vinegars.

The (volatile compound/internal standard) molecular ion peak area ratio for the identified volatile compounds was used for each compound. The range of linearity studied for each compound appears in Table 1. For those compounds with LOQ values higher than the lowest points of these ranges, the linearity evaluation was carried out in agreement with their LOQ values. The correlation coefficients were good ($r^2 > 0.98$). An excellent linearity was obtained in all cases for the range studied. This was

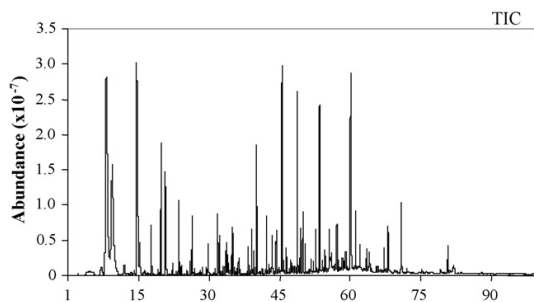


Fig. 1. Total ion chromatogram obtained for a vinegar sample by means of SBSE. Retention times (min): Ethyl isobutyrate (13.62); propyl acetate (13.99); isobutyl acetate (15.76); ethyl butyrate (16.84); *n*-butyl acetate (18.38); ethyl isopentanoate (18.46); hexanal (18.70); isobutanol (19.71); isopentyl acetate (20.57); ethyl pentanoate (20.77); 1-butanol (21.84); *trans*-2-hexenal (24.01); isoamyl alcohol (23.84); 2-methyl-1-butanol (24.12); ethyl hexanoate (24.65); hexyl acetate (25.80); 3-hydroxy-2-butanone (26.62); *cis*-3-hexenyl acetate (27.59); ethyl lactate (28.51); hexan-1-ol (28.87); *cis*-3-hexen-1-ol (30.04); *trans*-2-hexen-1-ol (30.82); ethyl octanoate (31.87); 2-furaldehyde (32.87); benzaldehyde (35.15); isobutyric acid (36.84); 5-methyl-2-furaldehyde (36.95); 2-acetyl-5-methylfuran (38.54); butyric acid (38.89); isovaleric acid (40.28); diethyl succinate (40.58); α -terpineol (41.51); benzyl acetate (42.64); ethyl-2-phenyl acetate (44.59); phenylethyl acetate (45.95); hexanoic acid (46.57); benzyl alcohol (47.03); 2-phenylethanol (49.21); 2-ethyl hexanoic acid (50.17); 4-ethylguaiaicol (52.87); octanoic acid (53.75); eugenol (57.21); 4-ethylphenol (57.36); 5-acetoxymethyl-2-furaldehyde (58.00); decanoic acid (60.39); diethyl fitalate (63.87); 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (68.90).

also corroborated by the “on-line linearity (LOL)”, with values higher than 97% (Table 1). This parameter is determined by the following equation in which $RSD(b)$ is the relative standard deviation of the slope (expressed as a percentage).

$$LOL(\%) = 100 - RSD(b)$$

Similar results, with LOL values higher than 97%, were also obtained for SPME [9].

3.1.2. Detection and quantitation limits and accuracy

Detection and quantitation limits were calculated from the calibration curves constructed for each volatile compound, using the Alamin Computer Program [20].

The limits of detection (three times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) and quantitation (ten times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) obtained (Table 2) are low enough to determine these compounds in real vinegar samples, taking into account their concentrations found in the studied samples. For SPME [9], the detection and quantitation limits obtained were higher than those obtained by SBSE. Several authors have established that SBSE exhibits a great potential with very low detection limits [8,10].

In order to check the accuracy of this analytical method, the technique of standard additions was used. A sample of representative vinegar was taken as the matrix and known quantities of the global standard solution were added at five levels and in triplicate. The slopes of the lines thus obtained for each of the aromatic compounds were compared with the corresponding slopes obtained in the calibration with standards (t criterion).

Table 1
Characteristics of the calibration curves

Compound	Studied range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Regression coefficient	Linearity (LOL, %)	Slope \pm SD	Intercept \pm SD
Ethyl isobutyrate	13.13–1093.75	0.9992	99.20	0.0030 ± 0.00001	0.0248 ± 0.01100
Propyl acetate	3.11–777.75	0.9957	98.25	0.0003 ± 0.00002	0.0064 ± 0.00181
Isobutyl acetate	29.69–2226.75	0.9900	98.47	0.0035 ± 0.00011	0.2970 ± 0.08621
Ethyl butyrate	2.35–141.06	0.9956	97.91	0.0035 ± 0.00010	0.0322 ± 0.00482
Ethyl isopentanoate	2.42–727.65	0.9990	99.02	0.0061 ± 0.00012	0.4369 ± 0.01910
<i>n</i> -Butyl acetate	8.62–862.00	0.9979	98.55	0.0008 ± 0.00003	0.0642 ± 0.00431
Hexanal	37.82–945.50	0.9953	97.56	0.0009 ± 0.00003	0.0620 ± 0.01070
Isobutanol ^a	0.47–35.09	0.9958	97.94	$5 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-7}$	-0.0025 ± 0.00163
Isopentyl acetate	106.61–3345	0.9980	97.27	0.0009 ± 0.00002	0.5393 ± 0.04171
Ethyl pentanoate	0.109–10.90	0.9956	98.07	0.0030 ± 0.00010	0.0013 ± 0.00032
1-Butanol	22.50–305.91	0.9994	98.76	0.0010 ± 0.00004	-0.0161 ± 0.00274
<i>trans</i> -2-Hexenal	47.19–1179.75	0.9975	98.83	0.0003 ± 0.000011	0.031 ± 0.0032
2-Methyl-1-butanol ^a	1.42–142.20	0.9876	97.51	$1 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$	0.1203 ± 0.03314
Isoamyl alcohol ^a	0.48–100.00	0.9919	97.81	$2 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	0.0133 ± 0.00421
3-Hydroxy-2-butanone ^a	3.38–2706.24	0.9973	98.71	$7 \times 10^{-7} \pm 2 \times 10^{-8}$	0.0436 ± 0.00232
Ethyl hexanoate	0.15–153.50	0.9983	99.02	0.0083 ± 0.00012	0.0154 ± 0.00452
Hexyl acetate	0.12–35.31	0.9976	98.67	0.0486 ± 0.00064	0.0366 ± 0.00861
<i>cis</i> -3-Hexenyl acetate	0.36–108.15	0.9989	99.16	0.0290 ± 0.00030	0.1362 ± 0.01060
Ethyl lactate ^a	0.13–33.71	0.9941	97.94	$2 \times 10^{-5} \pm 3 \times 10^{-6}$	0.0166 ± 0.00491
Hexan-1-ol	22.65–566.25	0.9986	99.47	0.0041 ± 0.00001	0.0007 ± 0.00172
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	16.29–1221.75	0.9987	98.86	0.0003 ± 0.00001	0.0009 ± 0.00200
<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	46.50–2823.75	0.9961	98.23	0.0005 ± 0.00003	0.5294 ± 0.01002
Ethyl Octanoate	0.11–380.75	0.9994	99.22	0.0607 ± 0.00342	0.0862 ± 0.00923
2-Furaldehyde ^a	1.03–15.25	0.9990	98.99	$3 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-7}$	0.0101 ± 0.00052
Benzaldehyde	1.96–196.00	0.9988	98.91	0.0005 ± 0.00006	0.0061 ± 0.00040
Isobutyric acid ^a	2.43–121.26	0.9953	97.82	$1 \times 10^{-5} \pm 2 \times 10^{-6}$	0.0107 ± 0.01791
5-Methyl-2-Furaldehyde	9.02–2310.00	0.9944	97.99	0.0002 ± 0.00003	0.0170 ± 0.00420
2-Acetyl-5-Methylfuran	1.46–1216.50	0.9978	98.75	0.0011 ± 0.00004	0.0087 ± 0.00670
Butyric acid ^a	1.92–47.88	0.9963	97.86	$2 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$	-0.0238 ± 0.01100
Isovaleric acid ^a	2.84–283.74	0.9944	97.62	$8 \times 10^{-6} \pm 1 \times 10^{-7}$	0.2888 ± 0.02252
Diethyl succinate ^a	0.05–1.11	0.9953	97.56	0.0009 ± 0.00004	0.0169 ± 0.01181
α -Terpineol	0.67–66.84	0.9983	98.79	0.0109 ± 0.00011	-0.0077 ± 0.00362
Benzyl acetate	0.75–751.00	0.9932	97.38	0.0020 ± 0.00012	0.1021 ± 0.01642
Ethyl-2-phenyl acetate	4.78–47.80	0.9953	97.20	0.0207 ± 0.00063	0.0473 ± 0.01590
Phenylethyl acetate ^a	0.14–4.70	0.9952	97.53	0.0024 ± 0.00010	1.7399 ± 0.13011
Hexanoic acid ^a	0.12–2.72	0.9967	97.98	0.0001 ± 0.00004	0.0045 ± 0.00253
Benzyl alcohol	25.18–5812.00	0.9980	98.79	$2 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$	0.0014 ± 0.00064
2-Phenylethanol ^a	2.13–21.28	0.9967	97.97	0.0001 ± 0.00002	0.1483 ± 0.02385
2-Ethyl Hexanoic acid	11.63–387.50	0.9960	97.79	0.0096 ± 0.00020	0.1198 ± 0.03210
4-Ethylguaiaicol	7.15–206.50	0.9961	97.80	0.0202 ± 0.00041	-0.0033 ± 0.00790
Octanoic acid ^a	0.06–6.41	0.9990	98.98	0.0004 ± 0.00002	0.0788 ± 0.01062
Eugenol	1.41–236.60	0.9980	98.81	0.0145 ± 0.00023	-0.0217 ± 0.01710
4-Ethylphenol	14.60–321.20	0.9956	97.65	0.0014 ± 0.00004	0.0041 ± 0.00521
5-Acetoxyethyl-2-furaldehyde	28.17–704.25	0.9968	97.99	0.0001 ± 0.00001	0.0003 ± 0.00012
Decanoic acid	6.73–1682.50	0.9966	97.94	0.0021 ± 0.00001	0.1282 ± 0.03471
Diethyl ftalate	1.12–37.21	0.9983	98.53	0.0934 ± 0.00131	0.0536 ± 0.01364
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde ^a	2.30–325.8	0.9972	98.46	$5 \times 10^{-7} \pm 2 \times 10^{-8}$	0.0023 ± 0.00011

LOL (% on-line linearity): $100 - \text{RSD}(b)$, $\text{RSD}(b)$ is the relative standard deviation of the slope (expressed as a percentage).

^a mg L^{-1} .

In general, no significant differences were found between them at a significance level of 5%.

Table 2 gives the data for the accuracy of each compound, determined by the slope of the line plotting the concentration found against the concentration expected.

Good accuracy values have been obtained, only isobutanol and *trans*-2-hexen-1-ol presented lower values, 85.01% and 80%, respectively.

For SPME [9], good accuracy values were obtained with the exception of 2,3-butanediol and 3-hydroxy-2-butanone, with 60% and 57%, respectively.

3.1.3. Repeatability and reproducibility

The repeatability and reproducibility have been evaluated by means of a series of five extractions of a commercial sherry wine vinegar performed using two different twisters. The mean concentration for all the identified volatile compounds, with their relative standard deviation (RSD) were calculated (Table 2). The RSD obtained for each twister ranges between 2.88% and 12.90%. The inter-twister accuracy showed RSD values similar to intra-twister accuracy (2.85–11.95%). Only, ethyl octanoate showed higher intra- and inter-twister RSD values.

Table 2
Performance characteristics

Compound	Detection limit (LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$)	Quantitation limit (LOQ, $\mu\text{g L}^{-1}$)	Accuracy (%)	Repeatability (RSD, %)	Reproducibility (RSD, %)
Ethyl isobutyrate	3.31	10.98	99.61	5.39	5.43
Propyl acetate	0.43	1.41	99.16	4.13	4.43
Isobutyl acetate	10.01	32.32	99.13	4.85	3.73
Ethyl butyrate	0.71	2.35	99.52	5.27	3.92
Ethyl isopentanoate	0.78	2.54	99.12	10.85	9.97
<i>n</i> -Butyl acetate	2.25	7.34	99.14	9.43	6.97
Hexanal	20.00	65.44	98.82	–	–
Isobutanol	150.22	500.12	85.01	2.97	3.42
Isopentyl acetate	33.00	110.23	98.44	4.68	9.17
Ethyl pentanoate	0.09	0.29	99.03	–	–
1-Butanol	4.13	13.09	99.23	–	–
<i>trans</i> -2-Hexenal	30.12	100.10	98.83	–	–
2-Methyl-1-butanol	1000.22	3328.07	99.43	12.90	10.62
Isoamyl alcohol	220.11	733.7	92.16	2.88	3.27
3-Hydroxy-2-butanone	2200.33	7332.66	99.26	9.49	7.46
Ethyl hexanoate	0.05	0.15	99.79	4.88	11.66
Hexyl acetate	0.05	0.15	99.11	11.47	11.78
<i>cis</i> -3-Hexenyl acetate	0.10	0.31	99.08	–	–
Ethyl lactate	50.01	165.23	99.82	–	–
Hexan-1-ol	8.60	27.67	98.91	–	–
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	7.83	25.70	99.03	–	–
<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	20.01	66.60	80.00	–	–
Ethyl Octanoate	0.04	0.13	99.15	17.00	19.00
2-Furaldehyde	0.5	1.65	99.04	5.53	4.06
Benzaldehyde	0.52	1.52	99.36	4.18	3.79
Isobutyric acid	888.00	2878.32	98.64	5.04	7.06
5-Methyl-2-Furaldehyde	4.51	14.99	98.65	6.41	4.25
2-Acetyl-5-methylfuran	0.34	1.12	99.71	–	–
Butyric acid	783.11	2609.77	99.2	9.70	11.95
Isovaleric acid	800.04	2660.87	98.97	4.98	6.32
Diethyl succinate	34.12	113.54	99.76	4.51	3.42
α -Terpineol	0.35	1.15	99.35	8.76	6.86
Benzyl acetate	0.22	0.73	99.57	5.28	5.08
Ethyl-2-phenyl acetate	1.13	3.66	99.08	9.12	6.39
Phenylethyl acetate	43.99	145.45	99.30	3.13	4.01
Hexanoic acid	50.00	165.12	99.40	4.55	10.84
Benzyl alcohol	10.01	31.21	99.16	3.24	2.91
2-Phenylethanol	641.07	2136.50	99.07	4.95	3.97
2-Ethyl Hexanoic acid	5.00	15.99	99.30	8.69	8.03
4-Ethylguaiaicol	2.22	7.30	99.43	3.43	2.85
Octanoic acid	32.11	106.99	99.00	9.80	10.73
Eugenol	0.35	1.15	98.79	4.57	3.61
4-Ethylphenol	5.12	16.12	98.16	7.21	6.13
5-Acetoxyethyl-2-Furaldehyde	10.01	33.12	99.23	–	–
Decanoic acid	2.12	7.01	98.82	4.90	4.37
Diethyl Ftalate	0.47	1.54	98.58	9.62	6.87
5-Hydroxymethyl-2-Furaldehyde	100.00	332.32	99.59	9.95	10.78

Repeatability (same twister, $n=5$) and reproducibility (different twisters, $n=5$).

For SPME [9], higher inter-fibre (2.5–20%) and intra-fibre (4.6–46%) accuracy values were obtained with considerable differences observed among the chromatographic responses obtained for each fibre and volatile compound.

These results corroborate the higher reproducibility of SBSE.

3.1.4. Matrix effect

Since acetic acid is one of the major constituents of vinegars and it exhibits a high volatility, it may compete with the volatile compounds in the extraction.

In a previous study [9], using SPME, it was found that the extraction efficiency was influenced by acetic acid content. So, in order to check this possible source of interference, the same amount of volatile compounds (alcohols, aldehydes, esters and acids) were added to five synthetic vinegar samples with different acetic acid content (0–90 g L^{-1}). Three extractions were analysed for each of these synthetic samples. The data obtained show that the higher the acetic acid concentration, the lower the extraction efficiency (Fig. 2). Although the absolute areas decrease, the

Table 3
Volatile compounds ($\mu\text{g L}^{-1}$) found in vinegars

Compound	Balsamic		Apple		Sherry			Tarragon	Pedro Ximenez	White wine
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ethyl isobutyrate	17.29	24.36	0.208 ^b	4.43 ^b	51.38	104.06	15.24	12.86	531.80	40.10
Propyl acetate	497.57	330.58	nd	246.58	305.77	178.92	136.30	nd	466.88	111.34
Isobutyl acetate	1427.2	977.8	847.5	1591.0	941.07	489.92	440.40	210.60	920.63	1620.4
Ethyl butyrate	27.20	14.50	48.25	762.72 ^a	20.99	34.01	13.37	1.03 ^b	285.60	28.19
Ethyl isopentanoate	14.15	14.13	19.40	20.59	196.00	344.66	92.97	55.55	766.94 ^a	170.93
<i>n</i> -Butyl acetate	1.23 ^b	1.27 ^b	4.02 ^b	836.71	37.7	76.65	10.70	3.32 ^b	229.05	19.34
Hexanal	nd	nd	661.63	392.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Isobutanol ^c	10.42	8.07	4.78	6.12	4.13	2.13	3.32	nd	4.86	7.11
Isopentyl acetate	3257.1	1882.5	386.99	3230.4	2776.0	1549.2	1171.7	609.77	2682.7	5204.4 ^a
Ethyl pentanoate	0.095 ^b	0.292	0.669	1.51	0.256 ^b	0.495	0.227 ^b	0.101 ^b	2.833	0.481
1-Butanol	40.96	51.06	59.64	103.22	96.27	98.18	77.75	54.3	68.96	62.82
<i>trans</i> -2-Hexenal	14.15 ^b	205.23	332.69	109.82	149.40	115.04	1.83 ^b	117.93	377.41	29.88 ^b
2-Methyl-1-butanol ^c	24.85	21.96	8.63	11.10	12.20	8.08	3.55	0.424 ^b	21.83	27.66
Isoamyl alcohol ^c	29.64	23.13	9.61	23.50	12.57	10.12	8.11	5.36	16.77	26.28
3-Hydroxy-2-butanone ^c	1326.9	898.69	284.41	309.61	871.62	265.29	706.08	441.97	309.37	415.87
Ethyl hexanoate	0.999	0.399	10.30	7.84	10.20	8.70	1.42	4.71	25.60	2.57
Hexyl acetate	0.140 ^b	0.172	89.23	401.40 ^a	0.314	1.95	0.039 ^b	0.021 ^b	6.80	0.694
<i>cis</i> -3-Hexenyl acetate	nd	nd	2.27	26.34	0.016 ^b	0.867	1.41	96.76	2.34	0.478
Ethyl lactate ^c	9.23	5.49	0.052 ^b	0.221	0.999	2.22	0.274	0.521	21.64	0.301
Hexan-1-ol	30.87	34.83	1869.6 ^a	6984.1 ^a	12.73 ^b	24.11 ^b	9.52 ^b	5.36 ^b	138.60	nd
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	18.75 ^b	20.08 ^b	40.18	851.54	27.79	51.97	34.05	2158.8 ^a	34.58	77.06
<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	nd	nd	150.12	1941.6	nd	nd	nd	50.00 ^b	nd	nd
Ethyl Octanoate	0.079 ^b	0.100 ^b	0.352	4.32	0.423	1.25	0.742	nd	1.88	1.39
2-Furaldehyde ^c	9.66	13.46	5.08	2.82	1.97	15.69 ^a	1.93	11.59	9.11	3.08
Benzaldehyde	77.53	22.27	116.28	51.62	343.91 ^a	197.14	137.97	159.39	142.01	388.83 ^a
Isobutyric acid ^c	22.50	34.58	46.60	29.21	67.86	39.61	38.65	14.48	73.43	38.43
5-Methyl-2-Furaldehyde	2778.4 ^a	2802.5 ^a	13.12 ^b	nd	118.61	244.92	122.58	2.09 ^b	1371.7	328.52
2-Acetyl-5-methylfuran	35.38	63.74	0.501 ^b	nd	9.87	4.40	3.92	nd	10.34	5.47
Butyric acid ^c	7.73	12.25	5.23	8.29	16.86	7.28	16.00	4.22	14.01	8.18
Isovaleric acid ^c	18.39	51.25	77.73	3.03	169.04	93.43	68.48	17.01	163.27	94.29
Diethyl succinate ^c	1.05	1.36	0.041 ^b	0.135	0.122	0.109 ^b	0.178	0.012 ^b	1.85 ^a	0.251
α -Terpineol	14.63	32.64	0.710 ^b	2.77	1.94	0.9131	2.14	5.92	11.75	2.91
Benzyl acetate	1.71	15.11	0.501 ^b	0.032 ^b	100.19	112.34	10.57	0.321 ^b	299.50	22.26
Ethyl-2-phenyl acetate	8.05	9.42	1.59	1.22 ^b	34.92	56.85 ^a	12.22	14.00	143.58 ^a	18.65
Phenylethyl acetate ^c	1.12	1.20	nd	0.185	1.53	1.02	0.597	0.804	1.24	2.33
Hexanoic acid ^c	1.52	2.18	2.71	4.96 ^a	3.61 ^a	1.49	1.52	0.956	2.47	1.64
Benzyl alcohol	699.42	1207.1	67.28	58.99	1630.5	1975.5	747.87	333.42	5676.6	732.74
2-Phenylethanol ^c	14.91	16.36	4.55	5.24	15.66	11.29	8.63	8.41	12.74	20.50
2-Ethyl Hexanoic acid	0.112 ^b	nd	nd	6.04 ^b	66.83	0.121 ^b	23.92	nd	nd	22.01
4-Ethylguaiaicol	40.58	37.53	nd	nd	56.99	11.69	28.33	20.11	3.97 ^b	24.22
Octanoic acid ^c	1.41	1.24	0.6771	8.06 ^a	1.71	0.960	0.810	0.6763	1.15	1.02
Eugenol	4.15	4.91	5.66	122.06	7.66	5.76	5.16	47.64	4.17	4.92
4-Ethylphenol	115.23	151.03	0.876 ^b	nd	209.54	126.34	100.33	32.53	50.61	61.15
5-Acetoxyethyl-2-furald.	4192.0 ^a	4284.5 ^a	50.76	nd	284.06	256.72	55.08	nd	4067.6 ^a	471.00
Decanoic acid	305.71	112.92	9.88	1505.7	109.75	82.49	84.61	64.75	52.93	54.74
Diethyl Ftalate	0.326 ^b	0.966 ^b	1.14 ^b	1.54	5.84	4.49	3.82	0.805 ^b	2.30	6.22
5-Hydroxymethyl-2-furald. ^c	268.45	379.29 ^a	6.67	nd	12.28	16.53	3.30	6.73	295.74	30.64

1 and 2, balsamic vinegars; 3 and 4, apple vinegars; 5–7, sherry wine vinegars; 8, tarragon vinegar; 9, Pedro Ximenez vinegar; and 10, white wine vinegar.

^a Values out of the studied range.

^b Values lower than LOQ; nd, not detected.

^c mg L^{-1} .

compound area/I.S. area ratio remains constant and the relative standard deviations are less than 15%. In general, for quantitative analysis, the I.S. may be used, so the acetic acid concentration does not affect the analytical data.

3.2. Determination of volatile compounds in vinegars

This analytical method was used to analyse several vinegar samples supplied by different producers. Each sample was analysed in triplicate.

Table 4
Comparison of SPME and SBSE for the determination of volatile compounds in vinegars

Compound	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	y = SBSE; x = SPME
<i>n</i> -Butyl acetate ^a	78.15 74.92	25.52 23.99	8.65 8.34	nd nd	nd nd	y = 1.0743x - 0.0027 (r ² = 0.9999)
Isoamyl alcohol ^a	63.16 65.18	279.27 283.56	235.56 232.14	74.19 73.14	130.30 128.45	y = 0.9756x - 0.1980 (r ² = 0.9812)
Isobutanol ^a	4.03 4.00	8.20 7.75	5.06 5.01	8.03 8.04	4.07 4.02	y = 1.0348x - 0.0480 (r ² = 0.9908)
Isopentyl acetate ^a	3.20 3.03	2.37 2.46	3.56 3.87	3.59 3.50	0.90 0.92	y = 0.9506x + 0.0489 (r ² = 0.9787)
Ethyl pentanoate	19.01 19.01	nd nd	nd nd	3.10 3.03	25.00 24.11	y = 1.0287 - 0.001 (r ² = 0.9988)
2-Methyl-1-butanol ^a	10.21 9.76	6.16 6.17	8.01 7.87	19.76 20.46	6.17 6.24	y = 0.9513x + 0.4387 (r ² = 0.996)
Isoamyl alcohol ^a	9.70 8.91	5.61 5.17	6.41 6.11	16.28 17.89	2.19 2.13	y = 0.9163x + 0.8125 (r ² = 0.9938)
3-Hydroxy-2-butanone ^a	508.74 509.51	424.76 451.79	322.02 302.10	120.55 130.86	443.13 438.14	y = 0.9924x - 0.7747 (r ² = 0.9868)
<i>cis</i> -3-Hexenyl acetate	0.41 nd	nd nd	nd nd	nd nd	0.51 nd	–
2-Furaldehyde ^a	5.31 4.72	7.72 7.71	5.89 5.81	3.98 4.40	2.72 2.48	y = 0.9454x + 0.3226 (r ² = 0.9953)
Benzaldehyde ^a	0.06 0.07	0.12 0.13	0.68 0.62	0.04 0.05	0.40 0.40	y = 1.0937x - 0.0113 (r ² = 0.9962)
Isovaleric acid ^a	16.26 14.62	25.19 25.65	146.61 134.93	74.47 72.35	180.84 178.06	y = 1.0360x + 0.5134 (r ² = 0.9980)
Diethyl succinate ^a	0.21 0.22	2.79 2.89	0.40 0.46	1.49 1.91	0.31 0.28	y = 0.9141x - 0.0132 (r ² = 0.9817)
Benzyl acetate	7.05 7.45	1.91 2.12	21.44 28.99	1.91 2.45	5.34 5.99	y = 0.8911x - 0.0287 (r ² = 0.9908)
Ethyl-2-phenyl-acetate	11.82 12.56	1147.77 145.49	24.96 24.22	9.18 9.58	nd	y = 1.0184x - 0.0004 (r ² = 0.9990)
Phenylethyl acetate ^a	0.21 0.21	0.21 0.22	0.18 0.17	1.97 2.22	4.16 4.05	y = 0.9874x - 0.0485 (r ² = 0.9848)
Hexanoic acid ^a	1.23 1.13	1.33 1.35	2.46 2.55	0.30 0.27	0.95 0.90	y = 0.9400x + 0.0929 (r ² = 0.9939)
Benzyl alcohol ^a	1.93 2.13	0.47 0.48	1.86 1.95	2.73 2.80	0.47 0.44	y = 0.9380x + 0.0325 (r ² = 0.9961)
2-Phenylethanol ^a	31.05 33.50	11.02 12.12	58.23 62.09	22.49 22.18	19.55 20.24	y = 0.9169x + 0.7095 (r ² = 0.9972)
4-Ethylguaiaicol	9.30 9.56	154.51 161.63	125.56 126.82	nd nd	nd nd	y = 0.9608x + 0.0056 (r ² = 0.9942)
Octanoic acid ^a	0.15 0.14	1.94 1.78	0.60 0.54	1.81 1.95	2.16 2.26	y = 0.9444x + 0.0691 (r ² = 0.9866)
4-Ethylphenol	237.54 267.81	62.84 56.16	749.38 798.90	130.05 129.80	12.04 14.22	y = 0.9309x + 0.0025 (r ² = 0.9990)
Decanoic acid	55.21 56.41	31.14 32.61	131.12 129.53	126.21 124.68	92.04 91.50	y = 0.9404x + 0.0043 (r ² = 0.9905)

Mean values ($\mu\text{g L}^{-1}$, $n = 2$). First value for each compound was obtained by SBSE.

nd, not detected.

^a mg L^{-1} .

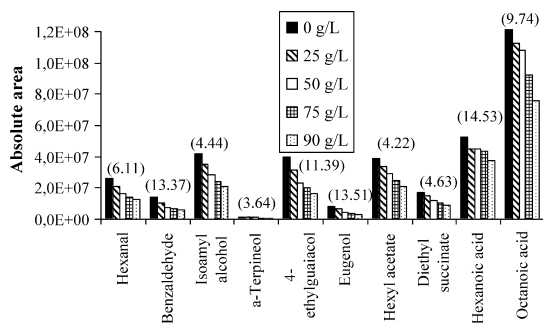


Fig. 2. Absolute molecular ion peak areas obtained for synthetic vinegar samples with different acetic acid content. Relative standard deviations in brackets (%) of the mean values of the relative areas (molecular ion peak area/internal standard area).

The mean results obtained for some of the vinegar samples are shown in Table 3. The major volatile compounds quantified in these samples were isobutanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-furaldehyde, 3-hydroxy-2-butanone, isovaleric acid, 2-phenylethanol, and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde.

Among the esters identified, which result from the fermentation of alcohols or by the reaction of acids with alcohols during aging, the major compounds were diethyl succinate, phenylethyl acetate, isopentyl acetate, and isobutyl acetate.

2- and 3-methyl-butanol have been found in other wine vinegars in a range of 10–100 mg L⁻¹ [21]. The 3-hydroxy-2-butanone content found ranged from 265.29 mg L⁻¹ for sherry vinegars to 1326.9 mg L⁻¹ for balsamic vinegars. A high content of 3-hydroxy-2-butanone in apple vinegars have been observed by other authors [22]. It was justified as a consequence of a low aeration during the acetification process. Palacios et al. [23] found that the 3-hydroxy-2-butanone content increased in sherry vinegars during their aging in wood as a consequence of the transformation of butyleneglycol into this compound during the process of the acetic fermentation and, of the general water loss produced during this period by evaporation. In our case, vinegars 1 and 2, balsamic vinegars with a long period of aging in wood, exhibit the highest contents in this compound.

Hexanal and *trans*-2-hexen-1-ol were only found in apple vinegars. Balsamic and Pedro Ximenez vinegars showed, as can be expected on the basis of their production process, very high contents in 2-furaldehyde, 5-methyl-2-furaldehyde, 5-acetoxymethyl-2-furaldehyde, and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde.

A further research is required in order to establish the statistically significant differences among vinegars obtained from different raw materials (white and red wine, cider, malted barley, honey, pure alcohol, etc.) and by different processes of aging.

3.3. Comparison of SBSE and SPME for the analysis of volatile compounds in vinegar

The SBSE analytical method validated here has been compared with a SPME methodology previously optimized by authors for the analysis of volatile compounds in vinegars [9].

Both analytical methods were used to analyse five vinegars supplied by different producers. The results obtained for these samples are shown in Table 4. Only volatile compounds analyzed by both methodologies appear in this table. Not all the compounds measured by SBSE are detected using the SPME technique, but those which are quantified by both methods show similar concentration values. In the column, a slope of one means perfect correlation between SBSE and SPME. As can be seen, the regression coefficients (r^2) for analysis by SBSE and SPME for the compounds quantified always exceeded 0.9800 (Table 4), indicating that results obtained from both methods are in agreement. Nevertheless, SBSE method is capable to study a higher amount of compounds.

4. Conclusions

Under the experimental conditions used in this study, SBSE can be considered an appropriate technique for the analysis of volatile compounds in vinegars. It is a very simple and solventless technique. The detection and quantitation limits, and the accuracies obtained for various volatile compounds are adequate for their quantitation in vinegars. Acetic acid competes in the extraction, but for quantitative analysis, the internal standard may be used. This technique is in good agreement with SPME technique and, in general, exhibits better sensitivity and reproducibility values.

References

- [1] J.M. Quirós, *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino* (1990) 115.
- [2] A. Rapp, H. Hastrich, L. Engel, *Vitis* 15 (1976) 29.
- [3] C.G. Edwards, R.B. Beelman, *J. Agric. Food Chem.* 38 (1990) 216.
- [4] A.C. Noble, R.A. Flath, R.R. Forrey, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 346.
- [5] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
- [6] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- [7] A. Zalacain, J. Marin, G.L. Alonso, M.R. Salinas, *Talanta* 71 (2007) 1610.
- [8] E. Durán, R. Natera, R. Castro, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 47.
- [9] R. Natera, R. Castro, M.V. García-Moreno, F. García Rowe, C.G. Barroso, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 261.
- [10] J. Marín, A. Zalacain, C. De Miguel, G.L. Alonso, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 1.
- [11] M.S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gandara, *Water Res.* 38 (2004) 1679.
- [12] F. Luan, A. Mosandl, A. Münch, M. Wüst, *Phytochemistry* 66 (2005) 295.
- [13] F. Luan, A. Mosandl, M. Gubesch, M. Wüst, *J. Chromatogr. A* 1112 (2006) 369.
- [14] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 449.
- [15] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 948.
- [16] A. Buettner, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2339.
- [17] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, *Anal. Chim. Acta* 546 (2005) 11.
- [18] J.C.R. Demyttenaere, J.I.S. Martinez, R. Verhe, P. Sandra, N. De Kimpe, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 221.
- [19] A. Isogai, H. Utsunomiya, R. Kanda, H. Iwata, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 4118.

- [20] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J.L. Sierra, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [21] G. Blanch, J. Tabera, J. Sanz, M. Herraiz, G. Roglero, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1046.
- [22] C. Llaguno, M.C. Polo, in: *El vinagre de vino*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España, (1991) p. 133.
- [23] V. Palacios, M. Valcárcel, I. Caro, L. Pérez, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4221.

Optimization of stir bar sorptive extraction applied to the determination of pesticides in vinegars

Enrique Durán Guerrero, Remedios Castro Mejías*,
Ramón Natera Marín, Carmelo García Barroso

*Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Cádiz, P.O. Box 40, Pol. Río San Pedro,
E-11510 Puerto Real, Cádiz, Spain*

Received 21 March 2007; received in revised form 18 June 2007; accepted 19 July 2007

Available online 1 August 2007

Abstract

Stir bar sorptive extraction (SBSE) has been evaluated for analysing pesticides in vinegar. The extraction analytical conditions have been optimised using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. After optimization, the proposed analytical conditions are: sample volume 40 mL, sampling time 150 min, and stirring speed 1000 rpm. On the basis of the results, it was decided not to add NaCl. The SBSE procedure developed shows detection limits and linear ranges adequate for analysing this type of compound, giving recoveries close to 100%. The repeatability and reproducibility values obtained were lower than 18 and 23%, respectively. The method was applied to a variety of commercial vinegars. SBSE is a very simple, solvent-free, and fast technique with high sensitivities.

© 2007 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Stir bar sorptive extraction; Vinegar; Pesticides; Two-level factorial design; Central composite design

1. Introduction

In spite of the trends towards adopting more ecological approaches in agriculture, it is still necessary to employ phytosanitary products in order to ensure both the required quality and quantity of very many crops.

Pesticides are used on agricultural products such as grapes and wine grapes, and consequently some of these compounds can be carried through the production process and into the finished wine [1] or wine vinegar.

For every common pest there exists a wide range of pesticides, of different chemical families, each with a different form of action [2]. Many products are recommended for the control of pests and diseases of the grapevine, and in one or other way, these may persist throughout the various stages of production, into the finished vinegar.

Most authorized insecticides and acaricides belong to the group of organophosphorous compounds, and these are also used mixed with oils for treatments applied during winter; most of the

fungicides used belong to the families of thiocarbamates, phthalimides, benzimidazoles and dicarboximides. Among the herbicides, the most commonly used are triazines and phenylureas [3].

When a phytosanitary treatment is applied a certain amount of the substance remains on the plant, and it is called pesticide deposit. This quantity of pesticide diminishes progressively over time, until the grapes are harvested, when only a small residue can be found. The most problematic pesticides are those applied close to the harvest such as the antitriptyrics [1].

The appearance of pesticide residues in wine, and therefore in the final vinegar, depends on several factors, as many as the number of stages comprising the production process [4].

Pesticide residues are not directly legislated in wine, but are generally regulated through the various national standards for foodstuffs, as a maximum residue limit (MRL) on the viniferous grapes. Today there is a trend to lower the MRL to be separate strictly for wine. The legislation is reducing the maximum permitted quantity of pesticides, with a clear intention to reach “zero tolerance” [5,6]. This trend has also been observed in vinegar and an increasing number of products are appearing on the market with the label: “ecological product”.

Another factor is the aromatic quality of the wine, and therefore of the vinegar, which can be modified by the presence of

* Corresponding author. Tel.: +34 56 01 63 63; fax: +34 56 01 64 60.
E-mail address: remedios.castro@uca.es (R. Castro Mejías).

pesticide residues during the fermentation [7–9]. The presence of pesticide residues and their degradation products may also influence negatively the stability of the finished wine, producing colloidal haze [10].

Therefore it is considered of commercial interest to possess reliable and sensitive methods for determining the levels of phytosanitary products in vinegars, not only because of the adverse effect their occurrence could have on the organoleptic characteristics of the vinegar [11], or because of the risk to public health that a large quantity of these residues could represent, but also for its implication in obtaining the denomination of “ecological vinegar”.

Numerous analytical methods have been developed for the determination of pesticides in wines by gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC). Generally prior to the chromatographic separation, a sample treatment is required [12–17]. Most of these are time and solvent consuming. Solvent-free sample preparation techniques based on sorptive extraction have been demonstrated to be good alternatives to traditional methods such as liquid extraction [18].

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a recently-developed technique [19–22] in which a stir bar coated with 50–300 μL of polydimethylsiloxane (PDMS) is employed to extract analytes from a variety of matrices. The extraction mechanism is similar to that of solid phase microextraction (SPME) based on PDMS sorption [23]. A magnetic stirring bar is added to the sample to promote the transfer of analytes to the polymer coating and, after a predetermined extraction period, the analytes are thermally desorbed in the GC injector.

The advantage of SBSE is the much higher mass of PDMS available, which results in high recoveries and higher sample capacity [24]. The applications developed with SBSE have shown low detection limits and good repeatability [25–27], which confirm the great potential of this technique.

Some previous applications of this technique to the analysis of pesticides in wine can be found [28,29], but it has never been applied to vinegar samples.

The present paper describes the optimization and validation of a stir bar sorptive extraction and thermal desorption procedure coupled to capillary gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pesticide residues in vinegar.

2. Experimental

2.1. Vinegar samples

A commercial Sherry vinegar sample spiked with the selected pesticides was used to optimize the extraction conditions and to determine some performance characteristics (recovery and precision). After optimization and validation, several commercial vinegars were analyzed.

2.2. Chemicals and reagents

Pesticides, comprising pyrimethanil, flufenoxuron, chlorpyrifos-methyl, vinclozolin, metalaxyl, fenitrothion, malathion, dicofol, chlorpyrifos, cyprodinil, triadimenol,

procymidon, hexythiazox, fludioxonil, iprodion, benalaxyl, fenhexamid were supplied by Sigma–Aldrich (PESTANAL, Riedel-de Haën, Seelze, Germany). A global stock standard solution was prepared by accurately weighing 5–10 mg of each individual pesticide standard into a 50 mL volumetric flask, dissolving with acetone and diluting to volume with ethanol. Working solutions used in calibration process, were prepared by diluting different amounts of the global standard solution in a synthetic vinegar solution (2 g/L of tartaric acid, 80 g/L of acetic acid, 1 g/L ethyl acetate, and 10 mL/L of ethanol, in Milli-Q water).

All these solutions were stored at 4 °C.

Heptachlor epoxide, supplied by Sigma–Aldrich, was employed as internal standard. NaCl was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

2.3. Sample preparation

The extractions were carried out with 20 mm \times 0.5 mm (length \times film thickness) PDMS commercial stir bars, supplied by Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany). After optimization, and for each SBSE analysis, 40 mL of sample (natural and synthetic vinegar) were pipetted and placed into a 100 mL Erlenmeyer flask. Each sample was spiked with 40 μL of a solution of heptachlor epoxide (3.42 mg/L in acetone). The Erlenmeyer flask was placed on a 15 position magnetic stirrer (Mülheim a/d Ruhr, Germany). The stir bar was stirred at 1000 rpm at 25 °C for 150 min. After removal from the vinegar sample, the stir bar was placed for a few seconds in distilled water and gently dried with a lint-free tissue. Then, it was transferred into a glass thermal desorption tube and then thermal desorption was carried out.

After each analysis and in order to remove completely all the possible pesticide residues that the stir bar may retain, a cleaning up procedure was performed (300 °C during 15 min). No measurable signal corresponding to any pesticide was detected after this.

2.4. Apparatus

The coated stir bars were thermally desorbed using a commercial TDS-2 thermal desorption unit (Gerstel) connected to a programmed-temperature vaporisation (PTV) injector CIS-4 (Gerstel) by a heated transfer line. The PTV injector was installed in an Agilent 6890 GC-5973 MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). An empty baffled liner was used in the PTV system. The thermodesorption unit was equipped with a MPS 2L autosampler (Gerstel) capable of handling the program for 98 coated stir bars. The desorption temperature was programmed from 30 to 300 °C (held for 10 min) at 60 °C min^{-1} under a helium flow (75 mL/min) and the desorbed analytes were cryofocused in the PTV system with liquid nitrogen at –150 °C. Finally, the PTV system was programmed from –150 to 300 °C (held for 5 min) at 10 °C s^{-1} for analysis by GC-MS. Capillary GC-MS analyses in the electron impact mode were performed on an Agilent 6890 GC-5973N MS system (Agilent, Little Falls, DE, USA), equipped with a HP-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 30 m \times 0.25 mm i.d., with a 0.25 μm

Table 1
Pesticides studied

Compound	Retention time (min)	Monitored ions ^a (m/z)
Pyrimethanil	13.19	198, 199, 200
Flufenoxuron	14.15	305, 126, 307
Chlorpyrifos-methyl	15.26	286, 288, 125
Vinclozolin	15.34	212, 198, 285, 187
Metalaxyl	15.94	206, 249, 160
Fenitrothion	16.61	125, 277, 109, 260
Malathion	17.33	173, 127, 125, 93
Dicofol	17.61	139, 250, 111
Chlorpyrifos	17.69	197, 199, 314, 97
Cyprodinil	18.97	224, 225, 210
Triadimenol	19.95	112, 168, 128
Procymidon	20.17	96, 283, 285, 67
Hexythiazox	20.33	156, 155, 227, 184
Fludioxonil	22.57	248, 127, 154, 182
Iprodion ^b	24.31	187, 244, 189
Benalaxyl	25.45	148, 91, 206
Fenhexamid	25.55	97, 177, 55

Retention times and monitored ions for each one.

^a The first one of each compound is its quantifying ion, the rest are their qualifying ions.

^b Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

coating. The carrier gas was helium at a flow rate of 1.0 mL/min. The GC oven was programmed as follows: held at 70 °C for 2.5 min, then ramped at 25 °C min⁻¹ to 150 °C. Then it was raised to 200 °C at 3 °C min⁻¹, and to 300 °C at 8 °C min⁻¹, then held for 10 min. The mass detector operated in EI+ mode at 70 eV. Selected ion monitoring mode, choosing for each compound one quantifying ion and two or three qualifying ions, was employed. The studied pesticides with their retention times and their selected ions are shown in Table 1.

The signal was recorded and processed with a RTL pesticides library supplied by Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA). Peak identification was carried out by analogy of mass spectra and confirmed by retention indices of standards.

Quantitative data from the identified compounds were obtained by measuring the relative molecular ion peak area in relation to that of heptachlor epoxide, the internal standard. Iprodione showed low thermal stability and was measured through its degradation product (3,5-dichlorophenyl) hydantoin [28].

2.5. Experimental design

The Statgraphics Statistical Computer Package “Statgraphics Plus 5.0” for Windows 98 was used for data treatment.

A sequential exploration of the response, which was carried out in two stages, was selected. In the first stage, in order to establish the relative influence of the factors and their interactions on the total chromatographic area obtained, related to the selected quantifying ions, four factors were selected: time of extraction, sample volume, stirring speed and ionic strength effect.

Therefore a factorial design of 2⁴ was chosen (16 experiments, in duplicate, undertaken in random order to avoid the effects of lurking variables). The values corresponding to the high (+), and low (–) points for each factor are shown in Table 2.

Table 2
Factor levels for the extraction condition optimization

Factor	Low (–)	High (+)	Centre	Axial (–α)	Axial (+α)
Sample volume (mL)	10	40	25	5.7	44.3
NaCl (M)	2.0	4.0	1.0	1.71	4.28
Extraction time (min)	20	150	85	1.3	167
Stirring speed (rpm)	500	1500			

In the second phase, this two-level factorial design was expanded to a star design. A central composite design (CCD, with $\alpha = 2.0796$) was obtained, since the centres of the two separate designs were coincidental. Table 2 lists the values given to each factor.

3. Results and discussion

3.1. Previous study

Baltussen et al. [19] found that the total amount of semivolatiles compounds extracted by SBSE depends on the phase ratio between sample volume and volume of PDMS sorbent. So, before optimizing the extraction conditions, a study was carried out to determine the most appropriate twister (stir bar). A sample of commercial vinegar spiked with the pesticides studied was extracted with four PDMS twistlers of different lengths (10 mm or 20 mm) and thicknesses (0.5 mm or 1.0 mm). On the basis of the results (data not shown), the 0.5 mm × 20 mm PDMS twister was selected. This provided a greater chromatographic area for all pesticides without exceeding the column capacity.

3.2. Extraction condition optimization

Time of extraction, sample volume, stirring speed and the addition of different amounts of NaCl were evaluated to reach the best overall analytical conditions. The factor extraction temperature has a significant influence on the SBSE efficiency, but a high temperature reduces the lifetime of the PDMS phase [30], so in this work, the extraction temperature was set at 25 °C.

Total chromatographic area of the quantifying ions corresponding to all the pesticides studied was selected as the experimental response for optimizing.

In this study, the desorption condition optimization (desorption time and temperature, helium flow and cryofocusing temperature) was not considered taking into account that in a previous work [27] we found that they had only a modest effect on chromatographic signals.

3.2.1. Screening by a 2⁴ factorial design

The initial screening design served to detect those variables that have the most influence on the experimental response.

The data obtained were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results are shown in bar chart format (Fig. 1). Extraction time, sample volume and NaCl concentration were significant parameters. Extraction time was the most

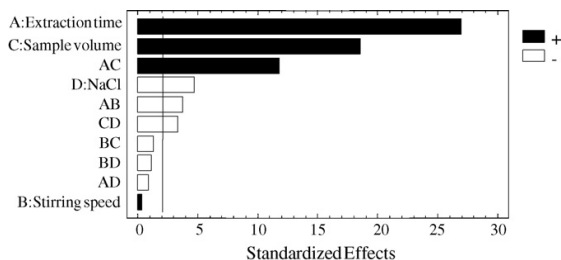


Fig. 1. Pareto chart of the main effects in the factorial 2^4 design for the pesticides studied.

influential variable. All the significant factors affected with a positive sign with the exception of NaCl concentration.

As can be seen in Fig. 1, the SBSE efficiency is also affected by the interrelated variables. The interaction between the factors extraction time and sample volume appears to be the most significant interaction statistically, with a positive sign. The interactions between extraction time-stirring speed and sample volume-NaCl were also significant (negative sign).

3.2.2. Optimization by a central composite design

Since stirring speed was not shown to be a significant parameter, in this study we decided to eliminate this factor. It was set at 1000 rpm. For the central composite design (CCD), the three parameters utilised were: extraction time, sample volume and NaCl. The axial values for these parameters are located on a sphere surrounding the two-level factorial design (Table 2).

After the CCD, as expected from the screening experiments, the extraction time and the sample volume appeared, with a positive sign, as statistically significant parameters (Table 3). Leon et al. [20] observed that for apolar compounds ($\log K_{o/w} > 3.5$), higher volume samples increased the chromatographic responses, whereas for polar analytes, increased volume samples had a little effect on the signals obtained.

In relation to extraction time, long extraction times by SBSE are normally required to reach the equilibrium [20,24]. Therefore, it is impractical to use the full capacity of the extraction phase in many applications. Good precision and reproducibility are obtained when the conditions are strictly controlled.

Among the two factor interactions, and based on the p -values and F -ratios of the ANOVA data (Table 3) the extraction

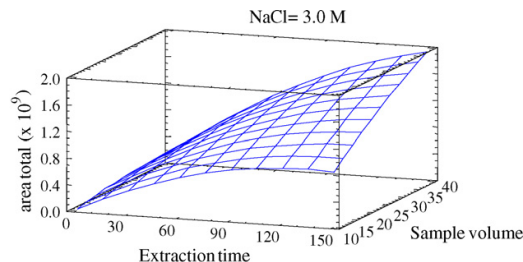


Fig. 2. Estimated response surface obtained using the central composite design by plotting extraction time vs. sample volume.

time-sample volume interaction was statistically the most significant.

The response surface plot obtained by plotting extraction time versus sample volume is showed in Fig. 2. As can be seen, a long sampling time (150 min) produces the extraction of a higher amount of pesticides when a high sample volume is used. For short extraction times the use of a higher sample volume, lightly increases the total chromatographic area.

In relation to the NaCl addition, it was not statistically significant for the central composite design whereas for the initial screening design, it had a negative influence on the experimental response. Taking these findings into account, a study with and without NaCl addition was carried out. A spiked vinegar sample was extracted five times with NaCl added (1.71 M), and five times without addition. The results showed that there were no statistical differences between the two types of samples for the most of the pesticides considered.

In addition, several authors have already described [20,24] that the recovery for more hydrophilic solutes ($\log K_{o/w} < 3.5$) dramatically increased on increasing concentration of NaCl; however, the recovery for more hydrophobic solutes ($\log K_{o/w} > 5$) considerably decreased. In our case, the pesticides studied exhibit a $\log K_{o/w} > 3$, so they are quite apolar and the addition of NaCl should decrease their recoveries.

On the other hand, the salt may damage the stir bar when it is not completely dissolved, so we decided to eliminate this parameter.

To sum up, after evaluation of the main factors and their interactions, the best conditions for extracting the pesticides of vinegar were: sample volume 40 mL, sampling time 150 min and stirring speed 1000 rpm without NaCl addition.

3.3. Performance characteristics

3.3.1. Calibration and linearity

Seven levels of concentration were tested in triplicate; these concentrations covered the concentration ranges expected for the various pesticide compounds in vinegars.

The [pesticide/internal standard] molecular ion peak area ratio for the identified pesticide was used for each compound. The range of linearity studied for each compound appears in Table 4. The correlation coefficients obtained for each compound (Table 4) were good ($r^2 > 0.99$). This was also corroborated by the “on-line linearity (LOL) = 100 – RSD(b)”, with

Table 3
Main effects and interactions in the central composite design

Effect	F ratio	p -Value
A: Extraction time	673.12	0.0000 ^a
B: Sample volume	338.03	0.0000 ^a
C: NaCl	0.26	0.6147
AA	50.70	0.0000 ^a
AB	82.94	0.0000 ^a
AC	0.01	0.9417
BB	5.07	0.0352 ^a
BC	0.85	0.3657
CC	0.32	0.5792

^a Values are significant at $p < 0.05$.

Table 4
Characteristics of the calibration curves

Compound	Linear range ($\mu\text{g/L}$)	Regression coefficient	Linearity (LOL, %)	Slope	Intercept
Pyrimethanil	0.54–540	0.9999	99.71	0.0079	–0.0047
Flufenoxuron	1.08–540	0.9994	99.11	0.0871	–0.0199
Chlorpyrifos-methyl	0.51–510	0.9991	99.28	0.3367	–0.8937
Vinclozolin	0.46–460	0.9996	99.46	0.0499	0.0368
Metalaxyl	1.05–1050	0.9965	98.36	0.0002	0.0017
Fenitrothion	0.5–100	0.9943	97.64	0.0194	–0.0267
Malathion	0.8–160	0.9940	96.81	0.0074	–0.0177
Dicofol	0.47–470	0.9992	99.37	0.3112	–0.5738
Chlorpyrifos	0.43–430	0.9994	99.30	0.2806	0.4549
Cyprodinil	0.55–550	0.9996	99.40	0.0085	–0.0032
Triadimenol	1.01–202	0.9933	97.80	0.0007	–0.0025
Procymidon	0.49–490	0.9981	99.05	0.0208	–0.0356
Hexythiazox	1–100	0.9957	97.67	0.1207	–0.2630
Fludioxonil	0.65–130	0.9931	97.07	0.0095	0.0049
Iprodion ^a	1.09–218	0.9927	97.24	0.0018	0.0074
Benalaxyl	0.48–96	0.9974	98.32	0.0425	0.0429
Fenhexamid	0.9–900	0.9996	99.38	0.0008	0.0180

^a Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

values higher than 97% (Table 4). RSD(*b*) is the relative standard deviation of the slope (expressed as a percentage).

3.3.2. Detection and quantitation limits and recovery

Detection and quantitation limits were calculated from the calibration curves constructed for each pesticide, using the Alamin Computer Program [31].

The limits of detection (three times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) and quantitation (10 times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) obtained (Table 5) are low enough to determine these compounds in real vinegar samples.

The technique of standard additions was used to check the accuracy of this method. A sample of representative vinegar was

taken as the matrix and known quantities of the global standard solution were added at seven levels and in triplicate. The slopes of the lines thus obtained for each of the pesticides were compared with the corresponding slopes obtained in the calibration with standards (*t* criterion). In general, no significant differences were found between them at $p < 0.05$.

Table 5 gives the data for the recovery of each pesticide, determined by the slope of the line plotting the concentration found against the concentration expected. Good recoveries have been obtained, with values ranging from 91 to 110%.

3.3.3. Repeatability and reproducibility

The repeatability and reproducibility have been evaluated by means of five series of five extractions of a commercial sherry wine vinegar spiked with the selected pesticides performed using five different twisters.

Table 5
Performance characteristic

Compound	Detection limit (LOD, $\mu\text{g/L}$)	Quantitation limit (LOQ, $\mu\text{g/L}$)	Recovery (%)	Repeatability (RSD, %)	Reproducibility (RSD, %)
Pyrimethanil	0.18	0.60	109.39	4.09	7.80
Flufenoxuron	0.19	0.63	102.59	4.36	22.22
Chlorpyrifos-methyl	0.23	0.77	93.20	5.91	2.06
Vinclozolin	0.16	0.53	97.34	1.77	3.37
Metalaxyl	0.81	2.7	101.78	5.78	16.99
Fenitrothion	0.34	1.13	109.81	10.31	7.93
Malathion	0.65	2.16	107.72	8.09	6.38
Dicofol	0.19	0.63	99.58	2.94	4.39
Chlorpyrifos	0.15	0.50	97.45	4.56	4.19
Cyprodinil	0.25	0.83	109.11	5.09	9.10
Triadimenol	0.64	2.13	96.27	17.16	14.40
Procymidon	0.30	1.00	99.81	6.23	6.61
Hexythiazox	0.14	0.46	92.93	8.58	4.34
Fludioxonil	0.60	2.00	91.69	6.94	8.49
Iprodion ^a	0.77	2.56	94.65	10.11	4.76
Benalaxyl	0.13	0.43	99.16	8.46	16.47
Fenhexamid	0.26	0.86	109.32	16.26	8.55

^a Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

Table 6
Pesticide residues ($\mu\text{g/L}$) found in commercial vinegars

Compound	Sherry vinegars		Non-sherry wine vinegars		Apple vinegars		Balsamic vinegars	
	1	2 ^a	3	4	5	6	7	8 ^a
Pyrimethanil	<D.L.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22.28	2.91
Flufenoxuron	n.d.	n.d.	<D.L.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.
Chlorpyrifos-methyl	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.
Vinclozolin	n.d.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	n.d.	<D.L.
Metalaxyl	n.d.	n.d.	186.03	n.d.	n.d.	n.d.	146.21	32.82
Fenitrothion	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.
Malathion	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Dicofol	<D.L.	<D.L.	<D.L.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorpyrifos	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.	n.d.
Cyprodinil	n.d.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	<D.L.	2.95	8.90	3.43
Triadimenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29.87	n.d.
Procymidon	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4.50	3.61
Hexythiazox	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fludioxonil	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.62	n.d.
Iprodion ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.71	n.d.
Benalaxyl	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<D.L.	n.d.	n.d.
Fenhexamid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	31.27	n.d.

n.d.: not detected; <D.L.: under detection limit.

^a Aged vinegars.

^b Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

The corresponding relative standard deviations (RSD) were calculated (Table 5). The RSD obtained for each twister ranges between 1.77 and 17.16%. The inter-twister precision showed RSD values similar to intra-twister precision (2.06–22.22%). In general, RSD values lower than 10% were obtained, confirming the high reproducibility of this technique.

3.4. Determination of pesticide residues in vinegars

This analytical method was used to analyse commercial vinegar samples from different raw materials (sherry and non-sherry wine vinegars, apple vinegars and balsamic vinegars) and different periods of ageing in wood. Each sample was analysed in triplicate.

The mean results obtained are shown in Table 6. In the bibliography no data are available concerning concentrations of pesticides in vinegars. Cyprodinil and fludioxonil were found in concentrations ranging from 0.9 to 28.6 $\mu\text{g/L}$ in Galician white wines [32]. Scarponi and Martinetti [33] determined these same fungicides in Italian white and rosé wines at levels of 30 $\mu\text{g/L}$ for cyprodinil and 34 $\mu\text{g/L}$ for fludioxonil. Iprodione and vinclozolin were found in several wines analysed by Pietschmann et al. [34]. In the case of Italian white and red wines, about 57% of the wines studied were positive for one or more pesticides usually used on grapes [35].

In our case, most of the pesticides were not detected or their concentrations were lower than the calculated quantitation limits. The highest concentrations for several pesticides were found in balsamic vinegars, ranging from 146.21 $\mu\text{g/L}$ for metalaxyl to 2.91 $\mu\text{g/L}$ for pyrimethanil. As can be seen, only small amounts of the pesticides used on the grapes and/or apples appear in commercial vinegars due, possibly, to their degradation and precipitation during fermentation and clarification processes [36].

4. Conclusions

The conditions for the analysis of pesticide residues in vinegars using SBSE-TD-GC-MS have been optimized by means of a statistical approach. Under the optimized conditions used in this study, SBSE can be considered an appropriate technique for the analysis of this type of compounds in vinegars. It is a very simple, solvent-free and fast technique. The detection and quantitation limits, and the recoveries obtained are adequate for the quantification of these compounds in vinegars, and especially for monitoring ecological products in which the use of pesticides is not permitted.

References

- [1] C. Sala, F. Foro, O. Busto, F. Zamora, L. Arola, J. Guasch, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 3668.
- [2] C. De Liñán, Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales, Ediciones Agrotécnicas, 2000.
- [3] P. Cabras, A. Angioni, J. Agric. Food Chem. 48 (4) (2000) 967.
- [4] H. Otteneder, P. Majerus, Bulletin de l'O.I.V. 78 (889–890) (2005) 173.
- [5] C.M. Cooney, Environ. Sci. Technol. 30 (9) (1996) 380A.
- [6] J.A. Pascual, M. Ros, P. Fernández, A. Bernal, A. Lacasa, International Conference on Waste Management and the Environment II, V. Popov, Greece, 2004, p. 251.
- [7] J. Oliva, M.A. García, S. Navarro, F. Pardo, A. Barba, Enólogos, Investigación y Ciencia 9 (2001) 18.
- [8] M.A. García, J. Oliva, A. Barba, M.A. Cámara, F. Pardo, E.M. Díaz-Plaza, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 1241.
- [9] C. Aubert, R. Baumes, Z. Günata, J.P. Lepoutre, J.F. Cooper, C. Bayonove, J. Int. des Sci. de la Vigne du Vin (1997).
- [10] I. Guguchkina, N.M. Ageeva, Sadovodstvo I Vinogradarstvo I Vinodelie Moldovy 12 (1990) 34.
- [11] J. Oliva, S. Navarro, A. Barba, G. Navarro, M.R. Salinas, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 2830.
- [12] P. Cabras, C. Tuberioso, M. Melis, M.G. Martini, J. Agric. Food Chem. 40 (1992) 817.

- [13] G.E. Miliadis, N.G. Tsiropoulos, P.G. Aplada-Sarlis, J. Chromatogr. A 835 (1999) 113.
- [14] L.F. López, A.G. López, M.V. Riba, J. Agric. Food Chem. 37 (1989) 684.
- [15] M.L. Hopper, J. AOAC Int. 71 (1988) 731.
- [16] A.M. Vitali, M. Guidotti, R. Giovinazzo, O. Cedrone, Food Addit. Contam. 25 (1998) 280.
- [17] M. Correia, C. Delerue-Matosb, A. Alves, J. Chromatogr. A 889 (2000) 59.
- [18] R. Castro, R. Natera, P. Benítez, C.G. Barroso, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 141.
- [19] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 737.
- [20] V.M. Leon, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Munoz, I. Valor, J. Chromatogr. A 999 (2003) 91.
- [21] A. Stopforth, A. Tredoux, A. Crouch, P. van Helden, P. Sandra, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 135.
- [22] J. Díez, C. Domínguez, D.A. Guillén, R. Veas, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 263.
- [23] C. Grote, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 69 (1997) 587.
- [24] C. Blasco, M. Fernández, Y. Pico, G. Font, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 77.
- [25] P. Popp, P. Keil, L. Montero, M. Rückert, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 155.
- [26] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 11.
- [27] E. Duran, R. Natera, R. Castro, C. Garcia Barroso, J. Chromatogr. A 1104 (1–2) (2006) 47.
- [28] P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, J. Chromatogr. A 928 (2001) 117.
- [29] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 948.
- [30] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, J. Chromatogr. A 1095(2005) 1.
- [31] A.M. García, L. Cuadros, F. Alés, M. Román, J.L. Sierra, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 381.
- [32] R. Rail, C. Yagüe, B. Cancho, J. Simal, J. Chromatogr. A 942 (2002) 41.
- [33] L. Scarponi, L. Martinetti, Vigneveni 1 (1999) 27.
- [34] M. Pietschmann, H. Hupf, A. Rappl, Lebensmittelchemie 54 (2000) 102.
- [35] M. Vitali, M. Guidotti, R. Giovinazzo, O. Cedrone, Food Addit. Contam. 15 (1998) 280.
- [36] G.J. Soleas, D.M. Goldberg, J. Wine Res. 11 (2000) 197.

Enrique Durán Guerrero¹
Fabio Chinnici²
Nadia Natali²
Ramón Natera Marín¹
Claudio Riponi²

Original Paper

Solid-phase extraction method for determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar

¹Analytical Chemistry
Department, Faculty of Sciences,
University of Cádiz, Puerto Real,
Cádiz, Spain

²Food Science Department,
University of Bologna, Bologna,
Italy

A solid-phase extraction method for the determination of volatile compounds in traditional balsamic vinegar (TBV) has been developed. The optimisation has been carried out using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. LiChrolut-EN SPE cartridges were used and the optimised analytical conditions were: 7 g of TBV diluted 1:4, 5 mL of washing water, and elution with 10 mL of dichloromethane. The linear ranges and detection and quantitation limits were adequate for the analysis of the studied compounds in TBV. The accuracy of the method was also studied: recoveries up to 80% and repeatability values lower than 15% were obtained for the majority of the studied compounds. Two TBVs of different age were analysed by the optimised method.

Keywords: Factorial design / Solid-phase extraction / Traditional balsamic vinegar / Volatile compounds

Received: May 21, 2008; revised: June 11, 2008; accepted: June 11, 2008

DOI 10.1002/jssc.200800307

1 Introduction

Traditional balsamic vinegar (TBV) of Modena and Reggio-Emilia is a typical product of the Emilia-Romagna region in the north of Italy. It is manufactured from the juice of white grapes (typically, Trebbiano grapes) boiled down to approximately 50% of its original volume to obtain a concentrated must, which is then fermented and subjected to a slow aging process which concentrates the flavours. The flavour intensifies over decades, with the vinegar being kept in fine wooden casks, and the final product is sweet, viscous, and highly concentrated. TBV is very labour-intensive to produce; while it ages and gradually evaporates thanks to wood porosity, the liquid is transferred to successively smaller casks made of different woods, becoming more concentrated with each transfer. Oak, mulberry, chestnut, cherry, juniper, ash, and acacia are the most commonly used woods, each of them with a typical porosity and aromatic impact. At the end of the process, the vinegar is taken from the smallest cask, each cask having been filled with the contents of the preceding (larger) cask and the original cooked must having been added to the largest cask. TBV is appreciated world wide for its extremely high cer-

tified quality. Its physicochemical properties have therefore been studied by several authors with regard to carboxylic acids [1], phenolic acids [2], furanic compounds [3], microbiology [4,5], heavy metals [6], as have the relationships between different parameters [7–9].

In complex matrices subjected to aging processes, study of the aroma plays a fundamental role in determining the quality of the final product. In the case of TBV, due to its complexity only few publications related to the analysis of volatile compounds exist [10–13]. Consequently, even today the extraction and concentration of volatile compounds in TBV constitute a problem that has still not been satisfactorily resolved. In particular, the high percentage of acetic acid present in TBV represents a serious problem, either for the chromatographic response, due to its elevated signal, or for the SPE extraction process, because acetic acid itself acts as a solvent [14].

The present paper describes the development (optimisation and validation) of a solid-phase extraction method with subsequent capillary gas chromatographic–mass spectrometric detection applied to the determination of volatile compounds in TBV. Optimisation of the extraction conditions has been carried out by means of an experimental design. This design allows the simultaneous variation of all experimental factors studied, and the detection of possible interactions among them that could influence the final result but are not detectable by classical experimental methods [15, 16]. Taking into account the complexity (an extraordinary density and the previously mentioned high content of acetic acid) of

Correspondence: Dr. Enrique Durán, Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Cádiz. P.O. Box 40, E-11510. Pol. Río San Pedro, Puerto Real, Cádiz, Spain
E-mail: enrique.duranguerro@uca.es
Fax: +34-956-01-64-60

Abbreviations: TBV, traditional balsamic vinegar

our matrix, sample amount, eluent volume, washing water volume, and dilution of the sample were evaluated. The effects of these parameters were investigated using a two-level factorial design expanded further to a central composite design. The juxtaposition of a two-level design with a star design (the centres of the two designs coincide) gives the mentioned composite design. It is one of the most useful designs for estimating a multi-factor response surface and has been previously used with excellent results for the study of volatile compounds and pesticides in Sherry wine vinegars [17, 18].

2 Experimental

2.1 Vinegar samples

Due to the high number of experiments needed for the optimisation and the shortage of TBV available, a mix composed of TBV (40%) and industrial balsamic vinegar (60%) was used to optimise the SPE extraction conditions and to determine the performance characteristics of the method. After optimisation and validation, two different samples of TBV with different aging histories were analysed using this methodology.

2.2 Chemicals and reagents

Two different types of SPE packings were studied; LiChroLut-EN cartridges (200 mg) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), C18 Isolute cartridges (1 g and 2 g) were purchased from IST (Hengoed, Mid-Glamorgan, UK).

The aroma standards used in this study were supplied by Aldrich (Milano, Italy) and Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA).

Individual concentrated solutions of each compound were prepared by weight in absolute ethanol. A global solution containing all the compounds was prepared by dilution of each individual solution in a unique volumetric flask. This global solution was used to prepare the working ones for the calibration curves and the performance characteristic. They were prepared in dichloromethane in order to reach a volume of 0.5 mL by evaporation in a stream of nitrogen before the injection in GC-MS. All the working solutions were stored at 4°C.

2-Octanol was employed as internal standard (514 mg/L in absolute ethanol).

2.3 Sample preparation

The extraction cartridges were conditioned with 4 mL of dichloromethane, followed by 4 mL of methanol and 4 mL of water.

After optimisation, extraction was carried out by passage of 7 g of sample, diluted 1:4 in Milli-Q water at around 1.5 mL/min, through the SPE cartridge. After this

step, and without taking the cartridge to dryness, a process of washing with 5 mL of water was carried out. After the washing process the cartridge was dried by passage of air. The compounds were recovered by elution with 10 mL of dichloromethane. The eluted samples were stored at -18°C for at least 24 h in order to freeze out the remaining water. Then the samples were filtered and 100 µL of internal standard (IS) solution were added to the filtered sample. Finally, a volume of 0.5 mL was attained by evaporation in a stream of nitrogen.

2.4 Instrumentation

Two µL of the extract were injected in the splitless mode (splitless time 0.60 min) into a Thermo Finnigan Trace GC ultra gas chromatograph (San Jose, CA), equipped with a Thermo Finnigan Trace DSQ selective mass detector, a merlin microseal injector, and a Stabilwax fused silica capillary column (Restek, Bellefonte, PA; 30 m, 0.25 mm id and 0.25 µm film thickness), under the following working conditions: GC grade helium as carrier gas at a flow rate (constant flow, vacuum compensation) of 1.0 mL/min, 62 kPa; column temperature program, 35°C heated, at 3°C/min, to 100°C, and then heated at 5°C/min to 240°C (held for 10 min). The injection temperature was 250°C. Detection was carried out by electron impact mass (EI) in the full scan mode, using an ionisation energy of 70 eV, transfer line 220°C. The mass acquisition range was 30–400 amu.

Peak identification was carried out using the NIST 2.0 and Wiley 7.0 libraries by comparison of mass spectra and confirmed by retention times of standards. Quantitative data for the identified compounds were obtained by measuring the relative peak area of their quantifying ions in relation to that of the IS (2-octanol).

2.5 Experimental design

The Statgraphics Statistical Computer Package “Statgraphics Plus 5.1” was used for the statistical treatment of the data.

In this study, a sequential exploration of the response was used and carried out in two stages. In the first stage, the relative influence of the factors and their interactions was studied for the total chromatographic area obtained. Four factors were selected as potentially affecting the SPE extraction: sample amount; eluent volume; washing water volume; and dilution of the sample.

Considering this, a 2⁴⁻¹ factorial design was chosen, which involved eight experiments, in duplicate, carried out in random order to avoid the effect of lurking variables. The values corresponding to the high (+), and low (-) points for each factor, chosen on the basis of previous experiments and bibliographic data, are shown in Table 1.

Table 1. Factor levels for the extraction condition optimisation.

Factor	Low (-)	High (+)	Centre	Axial (- α)	Axial (+ α)
Sample amount (g)	2	7	4.5	1.28	7.73
Eluent volume (mL)	10	50			
Washing water volume (mL)	5	30	17.5	1.41	33.59
Sample dilution	4	8	6	3.43	8.57

In the second stage, this two-level factorial design was expanded to a star design. A central composite design (CCD, with $\alpha = 1.287$) was obtained, since the centres of the two separate designs were coincidental. Table 1 lists the values assigned to each factor.

3 Results and discussion

3.1 Cartridge selection

Before the factorial design, a preliminary study was carried out to decide which cartridge could be the most suitable.

Our starting point was hence an SPE method for TBV [10], in which silica-based C18 and dichloromethane were used as cartridge packing and eluent, respectively. Even if not validated, that method appeared to be adequate for such a complex matrix.

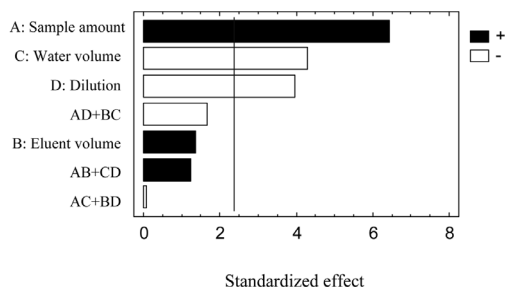
On the other hand, new SPE packing materials have emerged in recent years, in which silica has been substituted by polymeric resins, offering versatile and promising selectivity.

In particular, LiChroluth-EN resins have been already successfully used in wine analysis for the extraction of a wide range of volatile compounds [19–21].

Based on these considerations, three different commercial SPE cartridges (LiChrolut EN; C18-1 g, C18-2 g) were tested. Mean conditions: 5 g of sample (diluted 1:5), 15 mL of water for the washing step, and 20 mL of eluent, were used for the EN and C18-1 g cartridges whereas for the C18-2 g cartridge, in order to preserve the same sample/absorbent proportion, double values of the parameters were used. LiChrolut EN and C18-2 g cartridges showed approximately the same results in terms of total chromatographic areas (data not shown), but taking into account the higher sample amounts required and therefore the longer extraction time needed with the C18-2 g, EN cartridges were finally selected.

3.2 Extraction condition optimisation

Sample amount, eluent volume, washing water volume, and dilution of the sample were evaluated to achieve the

**Figure 1.** Pareto chart of the main effects in the factorial 2^{4-1} design for the volatile compounds studied. The line represents the significant limit.

best overall analytical conditions. Because the aim of the work was to develop an extraction method which covered the highest possible number of compounds, the total relative chromatographic area was used as experimental response for the optimisation.

3.2.1 Screening by a 2^{4-1} factorial design

The initial screening design detects which variables have the greatest influence on the experimental response.

The data obtained were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results are shown in bar chart format with the effects sorted in rank order (Fig. 1). Sample amount, washing water volume, and dilution of the sample were significant parameters, whereas the eluent volume did not exert a significant effect (at $p < 0.05$). The weight of sample was the most influential variable and showed a positive sign while washing water volume and sample dilution showed a negative sign. The interactions between the factors did not affect the SPE efficiency statistically, as can be seen in Fig. 1.

3.2.2 Optimisation by a central composite design

Because the eluent volume does not have a statistically significant effect, it was not considered in the study. It was set at 10 mL, the minimum value used in the previous design, in order to minimise the use of environmentally toxic solvent and to assure short extraction times.

The three parameters used in the central composite design (CCD) were: sample amount; washing water volume; and sample volume. The axial values for these parameters are located on a sphere surrounding the two-level factorial design (Table 2).

As expected from the screening experiments, according to the CCD the most influential variable was the sample amount, with a positive sign (Table 2). The washing volume is also significant and with a negative sign, which was a predictable result. Before undertaking the experimental design, the possibility of not using water at

Table 2. Main effects and interactions in the central composite design.

Effect	F ratio	p value	Sign
A: Sample amount	68.12	0.0000 ^A	+
B: Washing water volume	7.88	0.0106 ^A	-
C: Sample dilution	3.00	0.0982	-
AA	0.35	0.5604	+
AB	3.96	0.0598	+
AC	0.26	0.6180	+
BB	9.61	0.0054 ^A	+
BC	5.17	0.0335 ^A	+
CC	0.12	0.7340	-

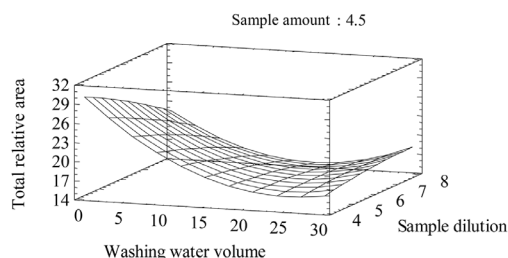
^{a)} Values are significant at $p < 0.05$.

all had been checked in several experiments, but some significant problems were encountered. The enormous amount of acetic acid remaining in the extract changed the separation behaviour of the cartridges and hampered the correct integration of the peaks emerging between 19.0 and 21.5 min (including the IS). To overcome these problems, a minimum water volume was found to be mandatory and this parameter was included in the experimental design. Although the dilution of sample was not statistically significant, there existed a two factor interaction between washing volume and dilution taking into account the p -values and F -ratios of the ANOVA analysis (Table 2). Figure 2 shows the response surface graph obtained by plotting washing volume vs. sample dilution. It can be seen that when small amounts of washing water volume are used, lower dilutions provide higher extraction efficiencies.

Table 3. Characteristics of the calibration curves.

Compound	Quantifying ions (m/z)	Studied range ($\mu\text{g/L}$)	r^2	Linearity (LOL, %)	Slope \pm S.D.	Intercept \pm S.D.
Isoamyl alcohol	55, 70	72.45–3622.86	0.9995	98.87	0.0075 \pm 0.0001	0.0036 \pm 0.0009
3-Hydroxy-2-butanone ^{a)}	43, 45	0.36–18.06	0.9989	98.66	0.0137 \pm 0.0002	0.0470 \pm 0.0118
Ethyl lactate	45	37.02–1851.43	0.9988	98.60	0.0162 \pm 0.0002	0.0047 \pm 0.0015
3-Ethoxy-1-propanol	59, 71	69.48–3474.27	0.9991	98.74	0.0052 \pm 0.0001	0.0026 \pm 0.0008
Furfural ^{a)}	95, 96	3.57–357.51	0.9940	96.53	0.0075 \pm 0.0003	0.4469 \pm 0.2757
Benzaldehyde	105, 106	3.53–176.79	0.9996	99.15	0.0578 \pm 0.0005	0.0011 \pm 0.0003
γ -Butyrolactone ^{a)}	42, 86	0.71–35.74	0.9998	99.29	0.0048 \pm 3×10^{-5}	0.0134 \pm 0.0033
Isovaleric acid ^{a)}	60	1.42–71.36	0.9958	97.36	0.0055 \pm 0.0001	0.1445 \pm 0.0374
Diethyl succinate	101, 129	0.60–7438.57	0.9964	97.89	0.0247 \pm 0.0005	0.0136 \pm 0.0125
Ethyl 2-phenylacetate	164	3.42–341.64	0.9976	97.17	0.0033 \pm 0.0001	0.0002 \pm 0.0001
Guaiaicol	109, 124	8.43–842.86	0.9999	99.40	0.0334 \pm 0.0002	-0.0002 \pm 0.0003
Benzylalcohol	79, 108	44.23–4422.86	0.9972	98.01	0.0196 \pm 0.0004	0.0082 \pm 0.0050
2-Phenylethanol ^{a)}	91, 122	1.44–72.15	0.9976	98.01	0.0128 \pm 0.0002	0.3661 \pm 0.0658
Whiskey lactone	99	12.29–1228.57	0.9971	97.79	0.0117 \pm 0.0003	0.0011 \pm 0.0009
Maltol	126	70.46–7045.71	0.9985	98.54	0.0123 \pm 0.0002	-0.0009 \pm 0.0036
Eugenol	164	6.6–660	0.9999	99.41	0.0163 \pm 0.0001	-0.0001 \pm 0.0001
4-Ethylphenol	107, 122	14.63–1462.86	0.9994	99.07	0.0437 \pm 0.0004	-0.0002 \pm 0.0017
Syringol	139, 154	3.62–7257.14	0.9998	99.41	0.0216 \pm 0.0001	-0.0020 \pm 0.0024
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde ^{a)}	97, 126	15.30–1529.71	0.9956	96.15	0.0012 \pm 4×10^{-5}	0.2879 \pm 0.2436
Phenylacetic acid ^{a)}	91, 136	0.07–7.18	0.9973	97.88	0.0166 \pm 0.0003	-0.0146 \pm 0.0070
Hexadecanoic acid	73, 129	69.48–3474.29	0.9994	98.62	0.0013 \pm 2×10^{-5}	0.0015 \pm 0.0002

^{a)} mg/L.

**Figure 2.** Estimated response surface obtained using the central composite design by plotting washing water volume versus sample dilution.

After considering all the main factors and their interactions, the best conditions for extracting volatile compounds of TBV are: 7 g of sample, 5 mL of washing water, a dilution of 1:4, and 10 mL of eluent. These conditions, therefore, represent an optimal compromise between extraction efficiencies, SPE elution time, reduced volumes of organic solvent, and reasonable cost in terms of sample amount needed for analysis (considering that the commercial price of TBV ranges between 80 and 120 €/100 mL).

3.3 Performance characteristics

A total of 21 compounds, covering different chemical families were studied. To choose representative compounds for each chemical class (Table 3), published data on volatile composition of TBV were taken into consideration [10–13].

Table 4. Performance characteristics of the method.

Compound	Detection limit (LOD, µg/L)	Quantitation limit (LOQ, µg/L)	Recovery (%)	Repeatability (RSD, %)	Reproducibility (RSD, %)
Isoamyl alcohol	20.18	67.25	–	8.32	4.19
3-Hydroxy-2-butanone	35.65	118.83	<50	21.38	18.04
Ethyl lactate	12.71	42.36	76.37	6.46	2.27
3-Ethoxy-1-propanol	19.53	65.11	<50	8.48	1.76
Furfural	53.03	176.77	113.73	1.55	2.96
Benzaldehyde	1.05	3.52	104.97	8.65	5.55
γ-Butyrolactone	168.04	560.13	<50	12.41	13.35
Isovaleric acid	496.42	1654.72	114.91	2.67	0.50
Diethyl succinate	4.13	13.77	85.10	6.73	8.57
Ethyl 2-phenylacetate	1.71	5.71	76.50	7.10	7.71
Guaiacol	1.93	6.45	76.36	12.14	7.74
Benzylalcohol	14.87	49.56	107.45	7.17	10.50
2-Phenylethanol	125.93	419.78	118.68	7.97	7.54
Whiskey lactone	3.01	10.03	86.42	7.95	18.76
Maltol	15.56	51.86	89.53	19.71	18.73
Eugenol	1.21	4.02	82.17	11.20	25.63
4-Ethylphenol	1.82	6.08	92.01	7.60	18.92
Syringol	0.35	1.17	61.07	21.75	21.41
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde	791.06	2636.87	–	19.71	24.70
Phenylacetic acid	29.72	99.06	<50	21.80	23.67
Hexadecanoic acid	20.95	69.85	<50	13.49	21.79

–: Not studied.

<50: Value lower than 50% of recovery.

3.3.1 Calibration, linearity

Five levels of concentration were tested in triplicate; these concentrations covered the concentration ranges expected for these compounds in TBV.

One or two majority ions were used to calculate the (volatile compound/internal standard) ion peak area ratio for each studied volatile compound (Table 3). The correlation coefficients were good ($r^2 > 0.99$) for all the studied compounds. To corroborate the excellent linearity values obtained, the “on-line linearity (LOL) = 100 – RDS(b)” was calculated for each compound, with values higher than 96%. RSD(b) is the relative standard deviation of the slope expressed as a percentage. All the characteristics of the calibration curves appear in Table 3.

3.3.2 Detection and quantitation limits

The Alamin Computer Program was used for calculation of the detection and quantitation limits from the calibration curves constructed for each volatile compound [22].

The limits of detection (three times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) and quantitation (ten times the relative standard deviation of the analytical blank values calculated from the calibration curve) obtained (Table 4) are low enough to determine these compounds in traditional balsamic vinegar samples according to the values found for them in the bibliography [10].

3.3.3 Accuracy: recovery, repeatability and reproducibility

In order to calculate the accuracy of the method, a study of recovery was carried out. Known concentrations of the volatile compounds were spiked to a sample and the concentrations before and after the addition were both determined. All the experiments were performed in triplicate. On the evidence of these concentrations, the percentage of recovery for each studied compound was calculated (Table 4). The majority of the compounds presented reasonably high values of recovery (higher than 75%). Compounds such as hexadecanoic acid, phenylacetic acid, 3-hydroxy-2-butanone, γ-butyrolactone, and 3-ethoxy-1-propanol presented lower values of recovery (<50%). Considering the high solubility of these compounds in water, the washing step could have negatively affected their recovery values; however, it is an essential step because of the necessity of reducing the amount of acetic acid in the samples. The isoamyl alcohol concentration level found in the used matrix was out of range. These high values for isoamyl alcohol came from the wine vinegars employed in the elaboration of industrial balsamic vinegar [13] which constituted part of the matrix, while the calibration focused on the minor levels present in the TBV. On the other hand, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde presented saturated chromatographic peaks that could not be precisely measured. The error arising in the measurement produced unstable recovery values for this compound. For these reasons, the recovery

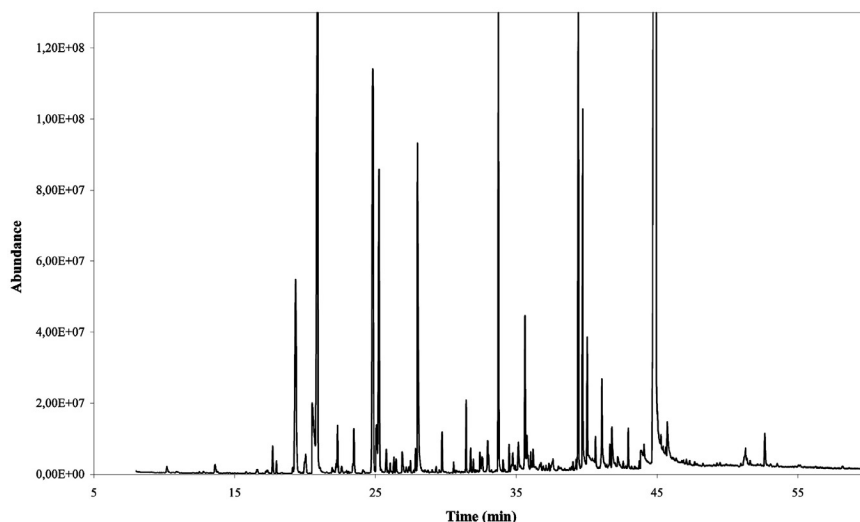


Figure 3. Total ion chromatogram obtained for TBV2 by means of SPE–GC–MS. Retention times (min): Isoamyl alcohol (10.79); 3-hydroxy-2-butanone (13.53); ethyl lactate (16.01); 3-ethoxy-1-propanol (17.26); furfural (20.8); benzaldehyde (22.8); γ -butyrolactone (26.29); isovaleric acid (27.96); diethyl succinate (27.96); ethyl 2-phenylacetate (30.73); guaiacol (32.52); benzylalcohol (32.94); 2-phenylethanol (33.71); whiskey lactone (34.47); maltol (34.76); eugenol (38.77); 4-ethylphenol (39.01); syringol (40.63); 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (44.75); phenylacetic acid (45.74); hexadecanoic acid (50.93).

of isoamyl alcohol and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde was not studied.

The intra-day (repeatability) and inter-day (reproducibility) precision of the method were calculated by means of five extractions of the sample performed at the same time and another five performed on different days. As can be seen in Table 4, the relative standard deviations (RSD) for the intra-day precision ranged between 1.55% and 21.80% (the higher RSD being verified for the compounds with lower recoveries) whereas the inter-day precision showed values of RSD between 0.50% and 25.63%. However, the majority of compounds gave values below 15% while, the high values of RSD, above all in the intra-day study, had also been reported by other authors [19].

In summary, taking into account recovery, repeatability, and reproducibility, the developed method reached an acceptable level of accuracy for the study of volatile compounds in TBV.

3.4 Determination of volatile compounds in TBV

Two different TBVs with different aging periods were analysed in triplicate using the developed method. TBV1 corresponds to a traditional balsamic vinegar with a minimum of 12 years of aging, while TBV2 is an “extravecchio” traditional balsamic vinegar, aged for at least 25 years. The mean results are presented in Table 5. Figure 3 shows the total ion chromatogram of the most

aged sample (TBV2) with the retention times of all the studied compounds.

The compounds present in higher concentrations (in the order of mg/L) were 3-hydroxy-2-butanone, furfural, γ -butyrolactone, isovaleric acid, 2-phenylethanol, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, and phenylacetic acid. The other volatile compounds identified in the samples presented concentrations in the order of μ g/L. Although 3-hydroxy-2-butanone and isovaleric acid are majority compounds of TBV, higher concentrations thereof have been found in other vinegars such as Sherry wine vinegars [23]. Furanic compounds such as furfural and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde are mainly formed in the must cooking stage of the elaboration process as a consequence of sugar degradation [7], but their concentrations increase with the aging process, as our experimental results seem to confirm. Other compounds derived from the wood leakage process such as whiskey lactone, eugenol, and syringol, show an increase of concentration from TBV1 to TBV2.

On the other hand, the concentrations of ethyl esters such as diethyl succinate decrease due to the shift in esterification equilibrium caused by the small amount of ethanol and probably also due to volatilisation [10]. The amounts of alcohols such as isoamyl alcohol and 3-ethoxy-1-propanol also decrease in TBV with aging.

The results obtained from this study will lead to further research focused on the study of TBV aroma, increas-

Table 5. Studied volatile compounds mean concentrations ($\mu\text{g/L}$) found in two real samples of TBV. Mean of three replicate analyses.

Compound	TBV1	TBV2
Isoamyl alcohol	237.63	100.03
3-Hydroxy-2-butanone ^{a)}	1.70	0.556
Ethyl lactate	126.05	<L.D.
3-Ethoxy-1-propanol	390.69	218.41
Furfural ^{a)}	75.24	90.22
Benzaldehyde	10.42	12.15
γ -Butyrolactone ^{a)}	0.86	1.37
Isovaleric acid ^{a)}	35.50	24.93
Diethyl succinate	21.37	<L.D.
Ethyl 2-phenylacetate	24.02	<L.D.
Guaiacol	<L.D.	12.43
Benzylalcohol	171.38	353.33
2-Phenylethanol ^{a)}	9.89	14.12
Whiskey lactone	70.78	1025.81
Maltol	446.28	791.35
Eugenol	8.13	23.49
4-Ethylphenol	47.09	94.90
Syringol	19.96	25.71
5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde ^{a)}	728.37	1456.47
Phenylacetic acid ^{a)}	2.71	2.79
Hexadecanoic acid	160.38	286.13

^{a)} mg/L.

TBV1: Aged for at least 12 years.

TBV2: Aged for at least 25 years.

<L.D.: Below detection limit.

ing the number of studied compounds. This could provide the information necessary for a clear understanding of the changes that take place during the elaboration process of this complex product.

4 Concluding remarks

The conditions for the analysis of volatile compounds in TBV by SPE–GC–MS have been optimised by means of a statistical approach. Under the optimised conditions developed in this study, SPE can be considered an appropriate technique for the extraction of this type of compound from matrices with the level of complexity of TBV. The detection and quantitation limits, and the accuracy obtained are adequate for the quantification of the studied compounds.

In view of the obtained results, the developed method can be used for further research related to the volatile

composition of TBV, increasing the number of studied compounds.

The authors wish to thank Professor Andrea Antonelli for the supply of the TBV samples analysed in this study.

The authors declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Cocchi, M., Lambertini, P., Manzini, D., Marchetti, A., Ulrici, A., *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5255–5261.
- [2] Plessi, M., Bertelli, D., Miglietta, F., *J. Food Compos. Anal.* 2006, 19, 49–54.
- [3] Chinnici, F., Masino, F., Antonelli, A., *J. Chromatogr. Sci.* 2003, 41, 305–310.
- [4] De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Giudici, P., *Food Microbiol.* 2006, 23, 809–813.
- [5] Solieri, L., Landi, S., De Vero, L., Giudici, P., *J. Appl. Microbiol.* 2006, 101, 63–71.
- [6] Corradini, F., Marcheselli, L., Franchini, G., Marchetti, A., Preti, C., Biancardi, C., *J. AOAC Int.* 1994, 77, 714–718.
- [7] Antonelli, A., Chinnici, F., Masino, F., *Food Chem.* 2004, 88, 63–68.
- [8] Masino, F., Chinnici, F., Franchini, G. C., Ulrici, A., Antonelli, A., *Food Chem.* 2005, 92, 673–679.
- [9] Masino, F., Chinnici, F., Bendini, A., Montevecchi, G., Antonelli, A., *Food Chem.* 2008, 106, 90–95.
- [10] Zeppa, G., Giordano, M., Gerbi, V., Meglioli, G., *Ital. J. Food Sci.* 2002, 3, 247–266.
- [11] Del Signore, A., *J. Food Eng.* 2001, 50, 77–83.
- [12] Cocchi, M., Durante, C., Grandi, M., Manzini, D., Marchetti, A., *Talanta* 2008, 74, 547–554.
- [13] Cocchi, M., Durante, C., Foca, G., Manzini, D., Marchetti, A., Ulrici, A., *Chemometr. Intell. Lab.* 2004, 71, 129–140.
- [14] Lee, M., Oh, S. Y., Pathak, T. S., Paeng, I. R., Cho, B. Y., Paeng, K. J., *J. Chromatogr. A* 2007, 1160, 340–344.
- [15] Morgan, E., *Chemometrics: Experimental Design*, Wiley, Chichester 1991, pp. 197–210.
- [16] Brereton, R. G., *Chemometric: Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems*, Ellis Horwood, Chichester 1990.
- [17] Durán, E., Natera, R., Castro, R., Barroso, C. G., *J. Chromatogr. A* 2006, 1104, 47–53.
- [18] Durán, E., Castro, R., Natera, R., Barroso, C. G., *J. Chromatogr. A* 2007, 1165, 144–150.
- [19] López, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V., *J. Chromatogr. A* 2002, 966, 167–177.
- [20] Cullerè, L., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V., *J. Chromatogr. A* 2003, 1017, 17–26.
- [21] Ibarz, M. J., Ferreira, V., Hernandez-Orte, P., Loscos, N., Cacho, J., *J. Chromatogr. A* 2006, 1116, 217–229.
- [22] García, A. M., Cuadros, L., Alés, F., Román, M., Sierra, J. L., *Trends Anal. Chem.* 1997, 16, 381–390.
- [23] Durán, E., Natera, R., Castro, R., Barroso, C. G., *J. Chromatogr. A* 2007, 1167, 18–26.

Traceability of Phytosanitary Products in the Production of a Sherry Wine Vinegar

ENRIQUE DURÁN GUERRERO,* RAMÓN NATERA MARÍN,
 REMEDIOS CASTRO MEJÍAS, AND CARMELO GARCÍA BARROSO

Analytical Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Cádiz, P.O. Box 40, E-11510,
 Pol. Río San Pedro, Puerto Real, Cádiz, Spain

In the present work, the monitoring of the evolution of the different phytosanitary products employed in the production of a Sherry wine vinegar has been carried out. The study covers the complete process, from the grape ripening to the vinegar fermentation. For the liquid sample analysis, a method based on SBSE (stir bar sorptive extraction) coupled to GC–MS and previously developed was used. For the grape samples, the use of two different extraction methods (ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction) was considered. Both methods were correctly optimized by means of factorial designs and were finally compared to each other. Considering the obtained results, the ultrasound extraction method was chosen to make the extraction of the solid samples. After the extraction process, the different extracts were analyzed by means of SBSE–GC–MS. The achieved results show the decrease of the phytosanitary product residues during the grape ripening, most of them being removed completely before the final product.

KEYWORDS: SBSE; Sherry wine vinegar; phytosanitary products; pesticides; traceability

INTRODUCTION

Phytosanitary products, or most commonly called pesticides, are chemical compounds usually used on agriculture in order to prevent the possible diseases originated by insect plagues, fungi or other pests to crops such as grapes. In the frame of Jerez, the most common families of pesticides used belong to the group of organophosphorous compounds, thiocarbamates, phthalimides, benzimidazoles, dicarboximides, triazines and phenylureas, each one used for a different disease (1).

A quantity of pesticide remains deposited on the grape and decreases progressively over time, until the grapes are harvested, when minimal residues can persist till the final product such as wine (2) or wine vinegar. The appearance of these pesticide residues into the final vinegar depends on several factors, as many as steps exist in the production process from the grape to the vinegar, including the intermediate must and wine (3). Depending on the pesticide and the production process, the evolution will be different. The chemical degradation is the essential way of elimination and logically depends on the chemical stability of the molecule (4). Sometimes, more toxic degradation products than the original substance are produced such as methyl paraoxon derived from methyl parathion (5). The reduction of these residue contents can be caused by adsorption onto the solid matter and subsequent elimination with the marc, by the action of yeasts and enzymes, the addition of fining

agents, acid hydrolysis, or acetic fermentation, among other processes (6–8). But even with all these processes, some pesticides can persist till the final vinegar (9).

Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) is a systematic preventive approach that addresses physical, chemical, and biological hazards as a means of prevention rather than finished product inspection. HACCP is used in the food industry to identify potential food safety hazards, so that key actions, known as Critical Control Points (CCPs), can be taken to reduce or eliminate the risk of the hazards being realized. In the case of vinegar production, phytosanitary product residues can be considered a CCP, so methodologies for their analysis, vigilance and correction must be proposed, in order to guarantee the traceability and food safety of vinegars from grapes treated with this kind of product. On the other hand, due to a progressive change in consumers, the number of products with the “ecologic” or “organic” label is increasing on the market. The use of phytosanitary products in the elaboration of these foods is forbidden. However, in the case of “organic wines” Andrey and Amstutz (10) revealed that 61% of 83 labeled “organic wines” found in Swiss marketplaces contained pesticide residues. So for vinegar, not only those companies producing “ecologic” vinegar but also those interested in the food safety of their products should monitor the complete vinegar production process.

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a fast, simple and relatively newly developed technique where a magnetic stirring bar of polydimethylsiloxane (PDMS) is added to the sample to

* Corresponding author. Phone: +34 956 016363. Fax: +34 956 016460. E-mail: enrique.duranguerro@uca.es.

Table 1. Factor levels for the extraction condition optimisation. UAE: Ultrasound assisted extraction; MAE: Microwave assisted extraction

values	UAE				MAE			
	sample (g)	solvent (mL)	extraction time (min)	centrifugation time	sample (g)	solvent (mL)	extraction time (min)	extraction T (°C)
low (–)	10	10	10	5	2	10	5	75
high (+)	30	50	20	15	10	30	20	125
center	20	30	15	10	6	20	12	100

promote the transfer of analytes to the polymer coating, and after a predetermined extraction period, the analytes are thermally desorbed in the GC injector. It has been successfully used in the analysis of pesticides on food samples such as vegetables (15), grapes (16), juices (17), wine (18, 19), and vinegar (9). On the other hand, the evolution of different pesticides from the processed grapes through the winemaking process to the final wine product has been studied (8, 11–14) but to date, a complete study of vinegar production traceability has never been carried out. In the present work, the monitoring of the evolution of the different phytosanitary products employed in the production of a Sherry wine vinegar covering the complete process, from the grape ripening to the vinegar fermentation, has been carried out. For grape samples, the use of two different extraction methods (ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction) was considered. Both methods were correctly optimized by means of 2⁴ factorial designs, and finally were compared with each other. After the extraction process, the different extracts were analyzed by means of SBSE–GC–MS. For the liquid sample analysis such as musts, wines and vinegars, a method based on SBSE–GC–MS and previously developed was used (9).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Pesticides, comprising Pyrimethanil, flufenoxuron, chlorpyrifos-methyl, vinclozolin, metalaxyl, fenitrothion, malathion, dicofol, chlorpyrifos, cyprodinil, triadimenol, procymidone, hexythiazox, folpet, fludioxonil, iprodion, benalaxyl, and fenhexamid were supplied by Sigma-Aldrich (PESTANAL, Riedel-de Haën, Seelze, Germany). A global stock standard solution was prepared by accurately weighing 5–10 mg of each individual pesticide standard into a 50 mL volumetric flask, dissolving with acetone and diluting to volume with ethanol. Working samples used in the analytical process development were prepared by spiking different amounts of the global standard solution on a quantity of clean crushed grape, homogenizing carefully prior to the extraction method.

The standard solution was stored at 4 °C.

Heptachlor epoxide, supplied by Sigma-Aldrich, was employed as internal standard.

Taking into account its poor stability (19), Iprodion was quantified by means of its degradation product (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

Sampling and Fermentation Conditions. All the grape samples (Palomino Fino variety) were taken from a local vineyard (southern of Spain) during the ripening process, from June to September of 2007. The sampling was carried out periodically every week, covering the studied field as much as possible. The number of bunches collected on each sampling was from 25 to 30. These bunches were subsequently mixed and homogenized, and were stored at –20 °C until they were analyzed.

The must and wine samples came from the studied grapes, and the sampling was carried out also weekly from September of 2007 to June of 2008, when the vinegar was made. During the alcoholic fermentation (two weeks), the sampling was carried out in a more exhaustive way, in order to achieve a better control of the process. In the same way, during the vinegar production process, which involved three days, samples were taken twice a day until the end of the process (7.92° acidity and 1.60° Baumé). Both processes, alcoholic and acetic fermentation, were carried out in industrial scale in the conventional

way (20). Briefly, for alcoholic fermentation, the pH of the must (obtained by means of 1.5 kg/cm² pneumatic press) was adjusted to 3.25 with tartaric acid; 100 mg/L SO₂ equivalent (potassium metabisulfite) were also added; the fermentation temperature was set at 25 °C, employing *Saccharomyces cerevisiae* as fermentation yeast. In the case of the acetic fermentation, the process was carried out in a cylindrical stainless steel reactor with concave bottom (submerged cultivation type) with a capacity of 33000 L, containing, at the start of the process, a load of vinegar to which the base wine is added. The process was subjected to a system of aeration from the bottom of the tank (70 m³/h). The temperature was set at 32 °C.

The treatment employed in the vineyard was the following: fungicides Vimar Combi (folpet and metalaxil) on April 2007 and Dimenol (triadimenol) on May 2007, both employed against *Oidium*; insecticide chlorpyrifos on June 2007, employed against *Lobesia botrana* (responsible for *Botrytis cinerea*).

Sample Preparation. The solid samples (grapes) were subjected to consecutive extraction processes. Ten grams of crushed sample was submitted either to ultrasound assisted extraction using 10 mL of methanol as a solvent, during 10 min, or to microwave assisted extraction using 10 mL of methanol as a solvent, during 5 min and reaching a temperature of 125 °C. After this, the extracts were centrifuged at 4000 rpm for 5 min. After centrifugation, 0.5 mL of the liquid was taken and added to 10 mL of Milli-Q water into a 100 mL Erlenmeyer flask in order to carry out the SBSE extraction. 20 mm × 0.5 mm (length × film thickness) PDMS commercial stir bars, supplied by Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany), were used. Each sample was spiked with 10 µL of a solution of heptachlor epoxide (342 µg/L in acetone). The Erlenmeyer flask was placed on a 15 position magnetic stirrer (Mülheim a/d Ruhr, Germany) and stirred at 1000 rpm at 25 °C for 150 min. After the extraction was finished, the stir bar was washed in distilled water and dried with a lint-free tissue. Finally, thermal desorption was carried out.

The liquid samples (musts, wines and vinegars) were extracted using a methodology developed in a previous work (9).

After each analysis, a cleaning up procedure was performed (300 °C during 15 min). After this treatment, the stir bars did not show any measurable signal of pesticides.

Apparatus. During the microwave assisted extraction optimization process, the microwave system used was the ETHOS-1600 (Milestone, Shelton, CT) closed vessel oven system equipped with 10 perfluoro alkoxy (PFA) vessels. Extractions were performed at 500 W. The system employed to carry out the ultrasound assisted extractions was supplied by Selecta (Barcelona, Spain).

In relation to the SBSE extraction, the coated stir bars were thermally desorbed using a commercial TDS-2 thermal desorption unit (Gerstel) connected to a programmed-temperature vaporization (PTV) injector CIS-4 (Gerstel) by a heated transfer line. The PTV injector was installed in an Agilent 6890 GC-5973 MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). The thermodesorption unit was equipped with a MPS 2 L autosampler (Gerstel) capable of handling the program for 98 coated stir bars. The desorption temperature was programmed in the following way: from 30 to 300 °C (held for 10 min) at 60 °C/min under a helium flow (75 mL/min). Cryofocusing temperature: –150 °C using liquid nitrogen. Final heating from –150 to 300 °C (held for 5 min) at 10 °C/s for analysis by GC–MS. Capillary GC–MS analyses in the electron impact mode were performed on an Agilent 6890 GC-5973N MS system (Agilent, Little Falls, DE). The column used was a HP-5 capillary column (J&W Scientific, Folsom, CA), 30 m × 0.25 mm i.d., with a 0.25 µm coating, and the carrier gas was helium at 1.0 mL/min.

Traceability of Pesticides in Vinegar

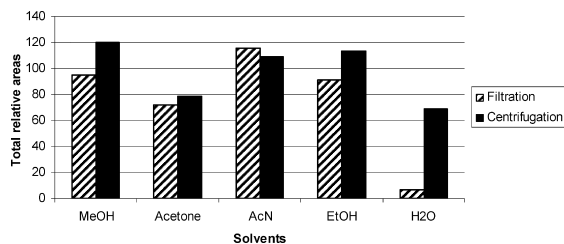


Figure 1. Ultrasound assisted extraction. Total relative areas obtained using different solvents with filtering or centrifuging. Studied solvents: methanol (MeOH); acetone; acetonitrile (AcN); ethanol (EtOH); water (H₂O).

The GC oven was programmed as follows: 70 °C for 2.5 min, then arriving to 150 at 25 °C/min; subsequently to 200 at 3 °C/min, and to 300 at 8 °C/min, being held for 10 min. The mass detector was operated in the EI+ mode at 70 eV. Selected ion monitoring mode, choosing for each compound one quantifying ion and two or three qualifying ions, was employed.

Experimental Design. The Statgraphics Statistical Computer Package “Statgraphics Plus 5.1” for Windows was used for data treatment.

Both studied extraction processes, ultrasound assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE), were optimized by means of 2⁴ factorial designs. **Table 1** gives the different considered analytical parameters and their maximum (+) and minimum (–) values for each optimization process.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of the Extraction Method. Two extraction methods (ultrasound and microwave) were developed by means of statistical approaches. For each case, 2⁴ factorial designs were employed involving 17 experiments in duplicate (a centerpoint for each factor was considered). Total chromatographic area of the quantifying ions corresponding to all the pesticides studied was selected as the experimental response for optimizing. After that, both methods were finally compared to each other in order to choose the optimal one for pesticide extraction from grapes.

Ultrasound Assisted Extraction. Previous Studies. The starting point was a method on ultrasound extraction (15) which seemed to be adequate to analyze pesticides in grapes, and from that, the possibility of using different solvents in the extraction method was checked. Several tests were carried out in order to select the optimum solvent and the cleaning step. A total amount of clean grape was weighed, crushed, spiked with a known quantity of pesticides and mixed during 5 min. Fifteen grams of the mix was employed to carry out each step, using 30 mL of methanol, acetone, acetonitrile, ethanol and water, and filtering (0.45 μm with prefilter of 0.1 μm) or centrifuging (4000 rpm during 6 min). All analyses were made in triplicate. After that, the extracts were analyzed by means of SBSE. The total relative areas obtained using different solvents (with filtration and centrifugation) are shown in **Figure 1**. As can be seen, the highest response was obtained using methanol and centrifugation. In general, better responses were obtained after centrifugation of the extracts. Therefore, methanol was selected as solvent and centrifugation was chosen as cleaning step prior to SBSE.

Ultrasound Assisted Method. Extraction Condition Optimization. Sample amount, volume of solvent, extraction time and centrifugation time were evaluated to achieve the best overall analytical conditions. The data obtained were evaluated by ANOVA at the 5% significance level. These results are shown in bar chart format with the effects sorted out in rank order

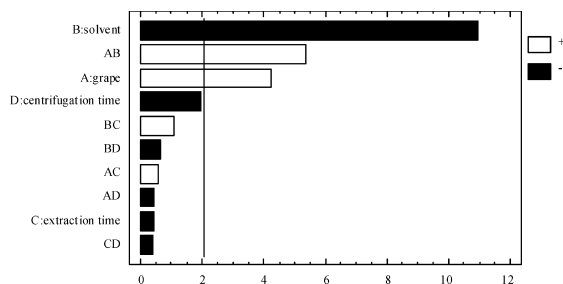


Figure 2. Ultrasound assisted extraction. Pareto chart of the main effects for the studied pesticides.

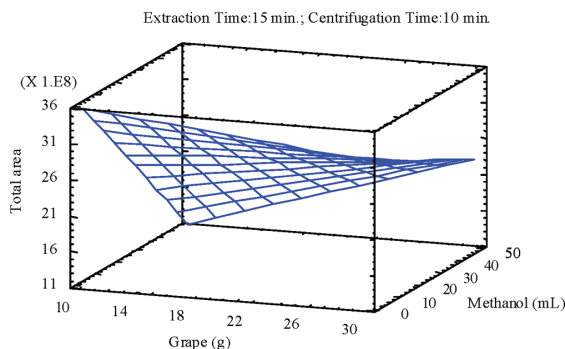


Figure 3. Ultrasound assisted extraction. Estimated response surface obtained by plotting sample amount vs volume of solvent.

(**Figure 2**). Volume of methanol had the higher significant effect, showing a negative sign. Sample amount was also a significant parameter, showing a positive sign, whereas centrifugation time and extraction time had not a significant effect (at $p < 0.05$). The figure also shows a positive interaction between sample amount and volume of solvent. **Figure 3** represents the estimated response surface taking into account the sample amount and volume of solvent as variables. The mentioned interaction can be seen, because when the employed volume of methanol is low, higher response is achieved with minor sample amounts, whereas when a high volume of methanol is employed, the obtained response practically does not change with the used sample amount. Therefore, the final selected conditions for the ultrasound assisted extraction were as follows: sample, 10 g; methanol, 10 mL; time extraction, 10 min; and time of centrifugation, 5 min.

Microwave Assisted Extraction. Previous Studies. Mean conditions were used as a starting point (21, 22), to compare different solvents usually employed in this kind of extraction. Five grams of sample was extracted with 20 mL of acetone, acetonitrile, ethanol, methanol and water successively, reaching to 100 °C during 10 min with a stirring of 30%. The refrigeration time used was 20 min, and all the extracts were centrifuged. **Figure 4** shows the mean values ($n = 3$) of relative areas of all the studied pesticides opposite the employed solvent. As can be seen, methanol acts as the best extractant; therefore it was selected as solvent for microwave assisted extraction.

Microwave Assisted Method. Extraction Condition Optimization. Sample amount, volume of solvent, extraction temperature and extraction time were evaluated to achieve the best overall analytical conditions. The values considered for each analytical parameter are listed in **Table 1**. The data obtained were evaluated by ANOVA ($p < 0.05$). These results can be seen in **Figure 5**. Sample amount was the most influential variable,

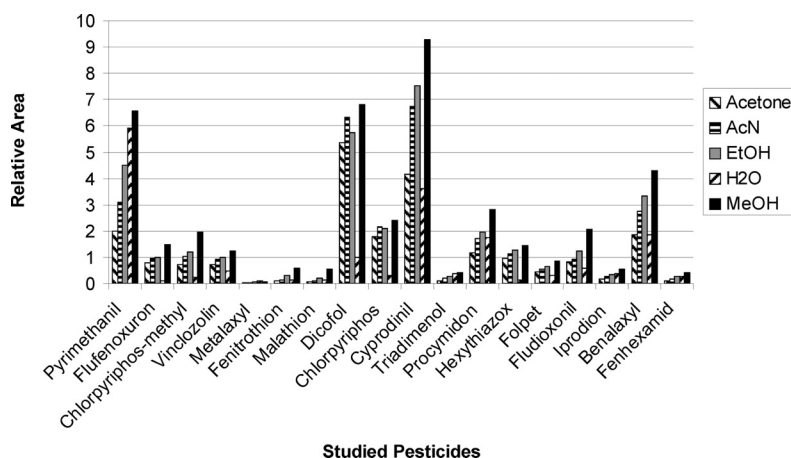


Figure 4. Microwave assisted extraction. Mean responses obtained for all studied pesticides using different solvents. Studied solvents: acetone; acetonitrile (AcN); ethanol (EtOH); water (H₂O); methanol (MeOH).

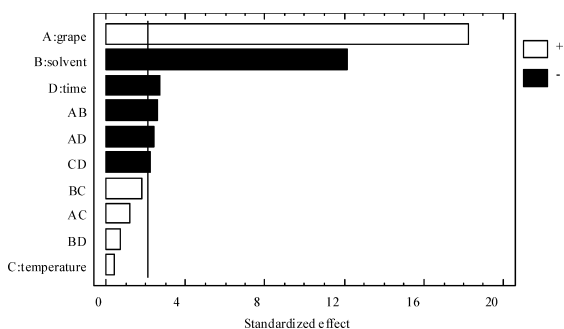


Figure 5. Microwave assisted extraction. Pareto chart of the main effects for the studied pesticides.

showing a positive sign. Volume of solvent was also influential but showed a negative sign. Extraction time and extraction temperature had a very low or insignificant effect (at $p < 0.05$). There are several significant interactions between the variables, but the most interesting is the interaction extraction temperature–extraction time (Figure 6). When shorter extraction times were used, higher values of extraction temperature allowed higher values of analytical response, whereas for longer extraction times and higher extraction temperatures, lower responses were obtained. Therefore, the final selected conditions for the microwave assisted extraction were 10 g of sample; 10 mL of methanol; 5 min of extraction time at 125 °C.

Comparison of the Optimized Methods. After optimizing both methods, 5 extractions of the same sample were carried out using each one and the results were compared. The obtained results (Figure 7) pointed out little differences in favor of the ultrasound method. Taking into account, in addition, its higher operational capacity, such as the possibility of doing more extractions at the same time or the possibility of avoiding the heating of the sample, the final selected method for the extraction of pesticides in grapes was the ultrasound assisted method.

Performance Characteristics. *Calibration, Linearity and Detection and Quantitation Limits.* Amounts of clean crushed grape were spiked with pesticides in eight levels of concentration in triplicate, and the complete extraction process was carried out. The [pesticide/internal standard] molecular ion peak area ratio for the identified pesticide was used for each compound. The correlation coefficients obtained for each compound (Table 2) were good ($r^2 > 0.99$). The range of linearity studied for

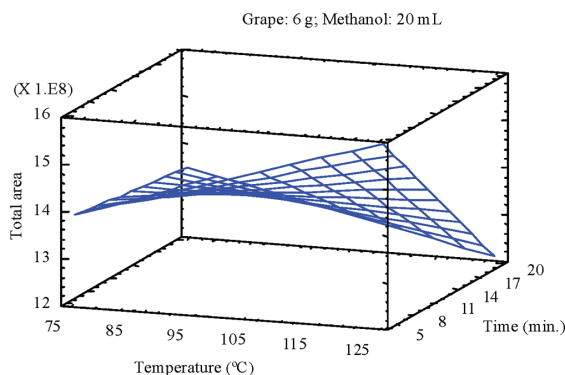


Figure 6. Microwave assisted extraction. Estimated response surface obtained by plotting extraction temperature vs extraction time.

each compound also appears in Table 2 and covered the concentration ranges expected for the various pesticides. This was also corroborated by the “on-line linearity (LOL) = 100 – RSD(b)”, with values higher than 96% (Table 2). RSD(b) is the relative standard deviation of the slope (expressed as a percentage).

The detection and quantitation limits were estimated by extrapolating to zero concentration from the calibration curves constructed for each pesticide, using the relative standard deviation of the analytical signal corresponding to a zero concentration value. In this way, these limits were calculated as three and ten times, respectively, the relative standard deviation of the analytical blank values obtained from the calibration curve. The values obtained (Table 3) are much lower than those permitted by the Spanish legislation (23).

Accuracy, Recovery and Repeatability. Two different known concentrations of pesticides were spiked to different grape samples (A and B) with different contents of water, in order to see the possible effect of variation of water during the grapes’ ripening. The complete extraction process was carried out, and both the concentrations before and after the additions were determined. The percentage of recovery was calculated for each studied compound on the evidence of these concentrations (Table 3). All the experiments were made in triplicate. As can be seen, the values of recovery range from 72% to 122%, acceptable values taking into account that the samples have been submitted to two successive processes of extraction (ultrasound

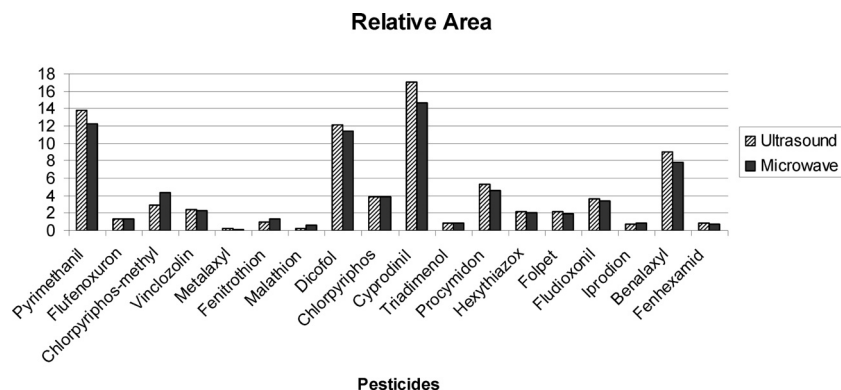


Figure 7. Mean results ($n = 5$) for all studied pesticides obtained from the comparison between ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction.

Table 2. Characteristics of the Calibration Curves

compound	linear range ($\mu\text{g/L}$)	regression coefficient	linearity (LOL, %)	slope	intercept
pyrimethanil	10.8–1080	0.9948	97.44	0.0168	-0.4904
flufenoxuron	10.8–540	0.9932	96.28	0.0017	0.0265
chlorpyrifos-methyl	10.2–510	0.9915	96.22	0.0026	-0.0449
vinclozolin	9.2–920	0.9957	97.51	0.0034	0.0089
metalaxyl	21–2100	0.9930	97.34	0.0001	0.0034
fenitrothion	10–500	0.9947	96.73	0.0009	-0.0217
malathion	16–800	0.9946	96.98	6×10^{-5}	-0.0005
dicofol	9.4–940	0.9926	97.12	0.0183	-0.0851
chlorpyrifos	8.6–860	0.9993	98.98	0.0045	-0.0305
cyprodinil	11–825	0.9958	97.83	0.0292	-0.3763
triadimenol	20.2–2020	0.9929	97.32	0.0007	-0.0064
procymidon	9.8–735	0.9964	97.87	0.0111	-0.1523
hexythiazox	10–1000	0.9942	97.45	0.0032	-0.0839
folpet	50–1000	0.9973	97.66	0.0005	-0.0351
fludioxonil	13–1300	0.9930	97.20	0.0045	-0.0902
iprodion ^a	21.8–1635	0.9966	97.78	0.0007	-0.0325
benalaxyl	9.6–960	0.9957	97.81	0.0126	0.1232
fenhexamid	18–1800	0.9912	97.02	0.0008	0.0333

^a Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

Table 3. Performance Characteristic

compound	detection limit (LOD, $\mu\text{g/L}$)	quantitation limit (LOQ, $\mu\text{g/L}$)	recovery (%)		repeatability (RSD, %)
			grape A	grape B	
pyrimethanil	7.34	10.34	98.74	112.52	3.81
flufenoxuron	8.14	11.43	74.96	80.13	19.93
chlorpyrifos-methyl	7.88	9.98	84.35	101.87	6.53
vinclozolin	7.99	9.21	94.6	99.58	2.67
metalaxyl	17.54	18.99	91.22	89.61	5.25
fenitrothion	8.87	10.12	87.39	115.13	8.42
malathion	10.34	15.87	72.81	112.09	2.95
dicofol	7.87	9.09	82.8	82.65	8.21
chlorpyrifos	6.70	8.78	102.14	118.73	5.65
cyprodinil	8.99	10.56	112.86	121.96	6.02
triadimenol	12.35	16.04	104.6	111.93	7.83
procymidon	6.76	8.34	83.22	78.08	4.80
hexythiazox	7.77	10.12	74.5	82.17	11.60
folpet	39.96	49.12	96.73	101.23	6.68
fludioxonil	10.03	13.45	82.48	120.73	5.92
iprodion ^a	17.45	20.56	84.39	120.34	10.14
benalaxyl	6.99	9.04	93.87	106.19	9.80
fenhexamid	14.76	19.34	86.17	107.99	5.87

^a Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

assisted extraction and stir bar sorptive extraction). No interference due to the different contents of water was also corroborated in view of these results.

In addition, both the polyphenolic content of the grape and its sugar content change during the ripening process. This fact can affect our extraction processes, therefore two studies, in reference

Table 4. Influence of the Polyphenolic and Sugar Content in the Pesticides' Extraction

compound	polyphenolic influence study (RSD, %)	sugar influence study (RSD, %)
pyrimethanil	10.92	11.17
flufenoxuron	25.21	22.34
chlorpyrifos-methyl	11.12	7.15
vinclozolin	8.53	9.37
metalaxyl	13.81	16.58
fenitrothion	14.80	7.83
malathion	12.14	8.74
dicofol	9.51	6.59
chlorpyrifos	10.00	8.97
cyprodinil	9.75	7.91
triadimenol	13.96	12.29
procymidon	10.06	12.72
hexythiazox	9.88	5.35
folpet	8.09	7.57
fludioxonil	13.60	9.81
iprodion ^a	14.41	10.79
benalaxyl	13.36	9.36
fenhexamid	10.23	9.91

^a Degradation product: (3,5-dichlorophenyl)hydantoin.

to this, have been carried out. On the one hand, various polyphenolic compounds were added in five different levels of concentration and in triplicate (gallic acid and *p*-coumaric acid from 12 mg/L to 0.12 mg/L; vanillic acid, protocatechuic acid and ferulic acid from 4 mg/L to 0.04 mg/L; caffeic acid from 20 mg/L to 0.2 mg/L) to a pesticide-spiked sample and then, the complete extraction process was carried out. On the other hand, and separately, different amounts of glucose were added in five levels of concentration and in triplicate (0 g/L to 150 g/L) to a pesticide-spiked sample in order to be subsequently subjected to the complete extraction process. The RSD values obtained can be seen in **Table 4**. Almost all values (except flufenoxuron) are lower than 15%. These results inform us that both the polyphenolic and the sugar content do not affect significantly the pesticide extraction process, and therefore, the optimized method can be applied to the complete ripening process.

The repeatability was calculated by means of five different ultrasound assisted extractions of five samples with a known amount of pesticides added, using after that five different stir bars. The relative standard deviations are showed in **Table 3** and are, in general, under 12%, which confirms the accuracy of the method. Only flufenoxuron shows a higher RSD (19.93%).

Monitoring of Pesticides during the Sherry Wine Vinegar Production. After optimizing and validating the grape extraction

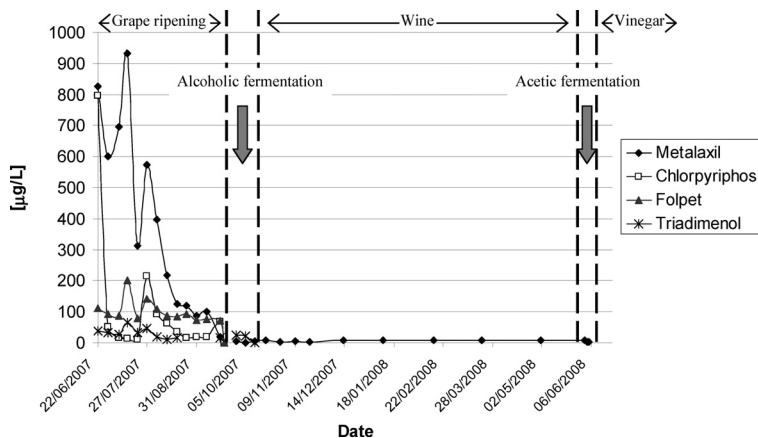


Figure 8. Evolution of four pesticides during the production process of a typical Sherry wine vinegar.

method, a monitoring of the pesticides during the complete process of production of a typical Sherry wine vinegar has been carried out. The traceability of this product involved the analysis of the grapes during the ripening; the analysis of the subsequent must during the fermentation process; the analysis of the produced wine till it was finally used to produce the vinegar; and the analysis during the acetic fermentation process. All the analyses were made in triplicate. Four pesticides were found during the traceability of the vinegar: metalaxil, chlorpyrifos, folpet and triadimenol, being those which were used during the ripening process. The evolution of these compounds during the process is shown in **Figure 8**. As can be seen, in general terms, all of them decrease and in some cases, drastically, during the period of ripening. Metalaxil goes from 931.91 to 19.52 $\mu\text{g/L}$ (97.90% of decrease), whereas chlorpyrifos started with values of 791.37 $\mu\text{g/L}$ arriving at the end of the ripening to values of 19.20 $\mu\text{g/L}$ (97.57%). The rest decreased but in a more moderate way. Folpet fell 64.33% (from 201.06 to 71.72 $\mu\text{g/L}$) and triadimenol decreased 74.96% (66.42–16.63 $\mu\text{g/L}$). Several authors have reported similar decreases of these pesticides due to their degradation and transformation in other products (4, 24, 25). Some irregular rises can be seen in the tendency of the pesticide degradation. This could be explained taking into account that the various grapes in the field were possibly not affected in the same way by the phytosanitary treatments. Although the sampling was made as much representative as possible, a low percentage of error always exists, but even with this experimental error, the trend of diminution of the pesticides is clearly shown. Chlorpyrifos and folpet disappeared just with the beginning of the fermentation process, whereas triadimenol remained during a pair of weeks, being completely degraded during the course of the fermentation process. Metalaxil decreased with the fermentation process but did not disappear, ranging from 7.81 to 3.83 $\mu\text{g/L}$.

Of these four pesticides, metalaxil and triadimenol show a certain water solubility (8400 mg/L and 95 mg/L respectively) whereas chlorpyrifos and folpet are practically insoluble in water, so this fact could explain the losses observed at the beginning of the alcoholic fermentation. These pesticides would be eliminated together with the solids derived from the fermentation process (dead yeasts, skins, seeds, stems). Hydrolysis phenomena could also explain these decreases. No data are available about the possibility of an enzymatic degradation of these compounds in must and wines.

Metalaxil did not disappear with the acetic fermentation either, finding lower values of 3.68–1.93 $\mu\text{g/L}$. Although this pesticide

presents a high persistence, also reported by other authors (26), the found values of the residues are low enough to consume this product without any kind of health risk (23).

As can be seen, it is important to have reliable and sensitive methods which allow determining the concentration of the residues of phytosanitary products, due to the high persistence of some of them. This is indispensable when dealing with products labeled as “ecologic”, where the use of this kind of phytosanitary products is completely forbidden by the corresponding legislation. In this work, a method of ultrasound assisted extraction for the determination of pesticides in grapes prior to SBSE–GC–MS analysis has been developed. It has been applied to study the traceability of the phytosanitary products employed during the production of a typical Sherry wine vinegar. Chlorpyrifos, triadimenol and folpet are completely eliminated during the vinegar production process whereas metalaxil remains in the final product, but in a very low concentration, safe for human consumption.

LITERATURE CITED

- (1) De Liñán, C. *Vademecum de Productos Fitosanitarios y nutricionales*; Ediciones Agrotécnicas: 2000.
- (2) Sala, C.; Fort, F.; Busto, O.; Zamora, F.; Arola, L.; Guasch, J. Fate of some common pesticides during vinification process. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3668–3671.
- (3) Otteneder, H.; Majerus, P. Pesticide residues in wine. Transfer from grapes. *Bull. O.I.V.* **2005**, 889–890, 173–181.
- (4) Katagi, T. Photodegradation of pesticides on plant and soil surfaces. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2004**, *182*, 1–189.
- (5) Dzyadevych, S. V.; Soldatkin, A. P.; Chovelon, J.-M. Assessment of the toxicity of methyl parathion and its photodegradation products in water samples using conductometric enzyme biosensors. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *459*, 33–41.
- (6) Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Pirisi, F. M.; Farris, G. A.; Madau, G.; Emonti, G. Pesticides in fermentative processes of wine. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3854–3857.
- (7) Nagayama, T. Transference of organophosphorus pesticides to wine from fruits during the process of making fruit wine. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **1997**, *38* (4), 270–274.
- (8) Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Melis, M.; Pirisi, F. M.; Minelli, E. V.; Cabitza, F.; Cubeddu, M. Fate of some new fungicides (cyprodinil, fludioxonil, Pyrimethanil, and tebuconazole) from vine to wine. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 2708–2710.
- (9) Durán, E.; Castro, R.; Natera, R.; Barroso, C. G. Optimization of stir bar sorptive extraction applied to the determination of pesticides in vinegars. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1165*, 144–150.

- (10) Andrey, D.; Amstutz, R. Determination of pesticide residues in "organic" wines on the swiss market. *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.* **2000**, *91*, 300–305.
- (11) Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Melis, M.; Pirisi, F. M.; Espinoza, J.; Mendoza, A.; Cabitza, F.; Pala, M.; Brandolini, V. Fate of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipyrim, and tetraconazole from vine to wine. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3249–3251.
- (12) Navarro, S.; Barba, A.; Oliva, J.; Navarro, G.; Pardo, F. Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 264–270.
- (13) Navarro, S.; Barba, A.; Navarro, G.; Vela, N.; Oliva, J. Multi-residue method for the rapid determination-in grape, must and wine-of fungicides frequently used on vineyards. *J. Chromatogr. A* **2000**, *882*, 221–229.
- (14) Navarro, S.; Oliva, J.; Navarro, G.; Barba, A. Dissipation of chlorpyrifos, fenarimol, mancozeb, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52* (1), 35–40.
- (15) Sandra, P.; Tienpont, B.; David, F. Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 299–309.
- (16) Juan-García, A.; Mañes, J.; Font, G.; Picó, Y. Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low- $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels in grapes by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1050*, 119–127.
- (17) Zuin, V. G.; Schellin, M.; Montero, L.; Yariwake, J. H.; Augusto, F.; Popp, P. Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 180–187.
- (18) Hayasaka, Y.; MacNamara, K.; Baldock, G. A.; Taylor, R. L.; Pollnitz, A. P. Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 948–955.
- (19) Sandra, P.; Tienpont, B.; Vercammen, J.; Tredoux, A.; Sandra, T.; David, F. Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine. *J. Chromatogr. A* **2001**, *928*, 117–126.
- (20) Casas, J. Descripción resumida de las técnicas enológicas de los vinos de Jerez. In *III Jornadas Universitarias sobre el Jerez*; Jiménez-Mena, Ed.; Universidad de Cádiz Press: Cádiz, Spain, 1985; pp 333–361.
- (21) Singh, S. B.; Foster, G. D.; Khan, S. U. Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiamethoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 105–109.
- (22) Bouaid, A.; Martín-Esteban, A.; Fernández, P.; Cámara, C. Microwave-assisted extraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in oranges by gas chromatography (GC). *Fresenius' J. Anal. Chem.* **2000**, *367*, 291–294.
- (23) Spanish Legislation: BOEn° 125, 23 of May 2008. Modification of R.D. 280/1994.
- (24) Jiménez, J. J.; Bernal, J. L.; del Nozal, M. J.; Bernal, J.; Toribio, L. Persistence and degradation of metalaxyl, lindane, fenvalerate and deltamethrin during the wine making process. *Food Chem.* **2007**, *104*, 216–223.
- (25) Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Melis, M.; Pirisi, F. M.; Farris, G. A.; Mendoza, A.; Sotgiu, C.; Minelli, E. V. Persistence and metabolism of folpet in grapes and wine. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 476–479.
- (26) Navarro, S.; Oliva, J.; Barba, A.; Navarro, G.; García, M. A.; Zamorano, M. Evolution of chlorpyrifos, fenarimol, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in red wines elaborated by carbonic maceration of Monastrell grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3537–3541.

Received for review December 1, 2008. Revised manuscript received January 19, 2009. Accepted January 19, 2009.

JF803729Y