



# **Trabajo de Fin de Máster**

---

Profiling volatiles of tropical fruits cultivated in the Canary Islands through headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometry detection

**AUTOR:**

Montserrat Saura Cayuela

**TUTOR/ES:**

Verónica Pino Estévez



**Dra. Verónica Pino Estévez, Profesora Titular del Departamento de Química,  
Unidad Departamental de Química Analítica, de la Universidad de La Laguna,**

**AUTORIZA:**

La presentación del Trabajo de Fin de Máster titulado “Profiling volatiles of tropical fruits cultivated in the Canary Islands through headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometry detection”, que ha sido desarrollado por **Montserrat Saura Cayuela** bajo mi dirección en los laboratorios de la Unidad Departamental de Química Analítica, ya que considero que reúne los requisitos para ser presentado y defendido ante el Tribunal designado al efecto.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo en La Laguna, a 7 de septiembre de 2021.

Fdo. Dra. Verónica Pino Estévez

C/ Padre Herrera s/n  
38207 La Laguna  
Santa Cruz de Tenerife. España

T: 900 43 25 26

[ull.es](http://ull.es)

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
*La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>*

Identificador del documento: 3780646      Código de verificación: Ddgeq088

Firmado por: Verónica Pino Estévez  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 07/09/2021 17:17:06



## **Agradecimientos**

Agradecer en primer lugar a Dra. Verónica Pino Estévez por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación. Gracias por reflejar todo su esfuerzo y dedicación, que la convierte en una persona admirable. A todos los profesores por guiarme en todo momento y enseñarme nuevos conocimientos en el ámbito de la química que me han sido de gran ayuda para el proyecto.

También quisiera agradecer a Dra. Idaira Pacheco Fernández por prestarme su ayuda y transmitir toda energía en todo momento. Gracias por enseñarme los misterios de la cromatografía de gases. A Dra. Maria José Trujillo Rodríguez por su predisposición, amabilidad y sobre todo por animarme a seguir en el mundo de la investigación.

A todos mis compañeros de laboratorio y de máster que de alguna manera han aportado su granito de arena en este año. En especial, Irina, Isaac, Santi, Adri y Patri, por hacer más amena mi integración en el grupo. A todos mis compañeros de grado que han continuado su camino, sois ejemplos de superación.

A mi pareja, por acompañarme en esta etapa siendo mi mayor apoyo en los peores momentos. Gracias por la paciencia y sobre todo por ser un pilar fundamental.

Por último, dar mi más sincero agradecimiento a mi familia. Gracias por apoyar todas mis decisiones y sentirse orgullosos de lo que hago.



## **Resumen**

Se ha desarrollado un método de microextracción en fase sólida en espacio en cabeza (HS-SPME) en combinación con cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis cualitativo y cuantitativo del perfil volátil de jugos de frutas tropicales de piña, maracuyá y mango, cultivadas en Canarias. El método fue optimizado empleando un diseño experimental y validado mediante técnicas de calibración externa en la matriz y/o adiciones estándar, haciendo una evaluación exhaustiva del efecto matriz. En el análisis cualitativo, se identificaron 55 compuestos volátiles característicos de estos alimentos, siendo los ésteres y terpenos las familias de compuestos más importantes. En el análisis cuantitativo, se detectó y cuantificó acetato de butilo y  $\alpha$ -pineno en las muestras de maracuyá y mango, con concentraciones en el nivel de microgramos por litro.

## **Abstract**

A headspace-solid-phase microextraction (HS-SPME) method in combination with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has been developed for the qualitative and quantitative analysis of the volatile profile of tropical fruit juices of pineapple, passion fruit, and mango, harvested in the Canary Islands. The method was optimized by an experimental design, and validated using matrix-matched external calibrations and/or the standard addition method, while performing an exhaustive evaluation of the matrix effect. In the qualitative analysis, 55 volatile compounds relative to this type of food were identified, with esters and terpenes as the most significant compounds. In the quantitative analysis, butyl acetate and  $\alpha$ -pinene were detected and quantified in fruit passion and mango, with concentrations in the microgram per liter level.





# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Frutas tropicales en las Islas Canarias .....	1
1.2. Importancia y características de las frutas tropicales.....	3
1.3. Análisis de compuestos orgánicos volátiles en frutas.....	4
1.4. Microextracción en fase sólida .....	8
1.4.1. <i>Importancia la determinación de VOCs mediante HS-                 SPME</i> .....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3. EXPERIMENTAL</b> .....	15
3.1. Reactivos, disolventes, disoluciones y muestras .....	15
3.2. Materiales.....	18
3.3. Instrumentación .....	19
3.4. Procedimientos.....	19
3.4.1. <i>Procedimiento de extracción-desorción mediante HS-                 SPME</i> .....	19
3.4.2. <i>Separación y detección de los analitos en GC-MS</i> .....	20
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	23
4.1. Optimización de métodos de GC-MS .....	23
4.1.1. <i>GC-QMS</i> .....	23
4.1.2. <i>GC-QQQMS</i> .....	25
4.2. Optimización del método de HS-SPME .....	26
4.2.1. <i>Tipo de fibra de SPME</i> .....	26
4.2.2. <i>Diseño experimental Doehlert</i> .....	28
4.3. Análisis cualitativo de los jugos de frutas haciendo uso de HS- SPME-GC-QQQMS .....	36
4.4. Análisis cuantitativo de los jugos de frutas haciendo uso de HS- SPME-GC-QQQMS .....	41
4.4.1. <i>Estudio del efecto de las matrices de jugos con respecto a los                 estándares acuosos</i> .....	41
4.4.2. <i>Validación del método cuantitativo con piña RE</i> .....	44
4.4.3. <i>Análisis cuantitativo de los jugos de frutas</i> .....	48

<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>6. ABREVIATURAS</b> .....	53
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	55

## 1. Introducción

### 1.1. Frutas tropicales en las Islas Canarias

Las frutas tropicales se definen como aquellas frutas que son producidas en regiones cálidas y húmedas, y que se ubican entre el Trópico de Cáncer y el Trópico de Capricornio, con una temperatura promedio en torno a los 27 °C (1). Los árboles frutales que los producen son de hoja perenne o siempreverdes, lo que implica que nunca se quedan sin hojas, a diferencia de lo que ocurre con los frutales de hoja caduca, que son comunes en las zonas de climas templados (2). Otra característica importante es que son frutales con escasa resistencia a heladas y que tienen poco o nulo desarrollo en regiones frías, con temperaturas inferiores a los 10 °C. Las frutas tropicales constituyen una fuente importante de la ingesta total de frutas en todo el mundo (3). Según los datos presentados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción, comercio y consumo de frutas tropicales ha aumentado significativamente en los últimos años, alcanzándose el valor de 7,7 millones de toneladas de fruta como récord de comercialización en 2019 (4).

Las frutas tropicales se clasifican según sus requisitos de temperatura en frutas tropicales en sentido estricto, tropicales pero adaptables y subtropicales. La Tabla 1 muestra los rasgos característicos y ejemplos de cada tipo.

**Tabla 1.** Clasificación de frutas tropicales.

<i>Tipo de fruta</i>	<i>Características</i>	<i>Ejemplos</i>
Tropicales	Requieren temperaturas medias mensuales superiores a los 20 °C	Durián Rambután Mangostán
Tropicales pero adaptables	Pueden adaptarse a medios subtropicales con inviernos más fríos	Platanera Mango Litchi
Subtropicales	Se cultivan en zonas subtropicales (hasta 40° de latitud)	Guayaba Chirimoyo Aguacate

En Canarias existen 6 frutales tropicales que tienen importancia como cultivo comercial: la platanera, la papaya, la piña tropical, el aguacate, el mango y el guayabo. Además, recientemente comienzan a desarrollarse comercialmente otras frutas como la

pitaya y las pasifloras (comúnmente denominadas parchitas o maracuyá), el litchi y el longan, el chirimoyo y la guanábana o el mamey. Algunas de estas frutas cultivadas en Canarias se comercializan fuera de las islas (2). En la Tabla 2 se indica la superficie utilizada para el cultivo de frutas tropicales o subtropicales en Canarias en el periodo 2015-2020 (5).

**Tabla 2.** Superficie destinada al cultivo de frutas tropicales en las Islas Canarias.

<i>Cultivo</i>	<i>Superficie (ha)</i>
Platanera	8942
Aguacate	1528
Mango	416
Papaya	267
Piña tropical	150
Maracuyá	7,16

Como se puede observar en la Tabla 2, en las islas se cultivan principalmente plátanos. De hecho, los plátanos canarios constituyen casi el 100% de los cultivados en España y aproximadamente el 60% a nivel europeo (6). Por otra parte, el mango, que ocupa el tercer puesto en cuanto a cultivo, es una de las frutas tropicales canarias más demandadas por los consumidores y se produce principalmente en La Gomera (6). Mientras, la piña se cultiva en El Hierro y La Palma, principalmente en la variedad de Roja Española. El cultivo del maracuyá, comparado con el resto de las frutas tropicales, tal y como se observa en la Tabla 2, ha sido tradicionalmente muy minoritario y marginal en las Islas Canarias. En la última década, tras un renovado interés por esta fruta exótica tanto por parte de los consumidores como de algunos productores e investigadores, se han establecido líneas de trabajo en apoyo a la implantación y al desarrollo comercial de esta especie en las islas. Fruto de este esfuerzo, se ha avanzado en el conocimiento de estos frutales subtropicales en aspectos importantes relacionados con el cultivo, tales como la adecuada elección del material vegetal, la polinización o el entutorado (técnica agrícola en la que se crea una estructura que da soporte a determinadas plantas y ayuda a su crecimiento) y poda. Teniendo en cuenta los rendimientos y la calidad de la fruta obtenida, a nivel local y de exportación, se espera un notable crecimiento en los próximos años (7).

## **1.2. Importancia y características de las frutas tropicales**

El principal modo de consumo de las frutas tropicales es como fruto fresco, aunque también se consumen en menor medida en otros alimentos como mermeladas, gelatinas, jugos o yogures (2). La importancia adquirida por parte del consumo de estas frutas radica en dos razones principales: su valor nutricional y sus propiedades organolépticas. Dada la creciente conciencia sobre el efecto del consumo de los alimentos en la salud, las frutas tropicales se han convertido en parte esencial de la dieta básica en la mayoría de las regiones del mundo, especialmente debido a su concentración de compuestos bioactivos, vitaminas, fibras, y minerales, entre otros (8). Por ejemplo, las frutas tropicales de pulpa amarillo-naranja, como el mango y la papaya, tienen alto contenido en vitamina A y en carotenos (2). El mango y el guayabo también son ricos en vitamina C. El plátano y el aguacate, por su parte, son ricos en minerales como el potasio y el calcio, respectivamente. El aguacate además tiene un alto contenido en grasas de alta digestibilidad que ayudan al control del colesterol.

Además del creciente reconocimiento de su valor nutricional y terapéutico, los consumidores buscan nuevas experiencias de notas sensoriales del sabor y olor de frutas exóticas, que son las principales características organolépticas de estos alimentos (9). Estas propiedades surgen de una combinación compleja de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y semivolátiles que son propios de cada fruta (10). Esta fracción volátil, además, también juega un papel importante en obtener un mayor aprovechamiento nutricional de la materia prima (11,12).

Conviene mencionar que el término "fracción volátil" se usa en aplicaciones a gran escala para definir en general una mezcla de compuestos volátiles en una matriz de origen vegetal que puede muestrearse, debido a su capacidad para vaporizarse espontáneamente y/o en condiciones o técnicas adecuadas (13). Por este motivo, el perfil volátil puede presentar modificaciones considerables según especie y variedad de la fruta, la región geográfica donde se cultivó, el procedimiento de elaboración, así como el grado de maduración del fruto (14).

Cabe asimismo destacar que, en lo que respecta a las frutas tropicales, en la mayoría predomina el contenido de terpenos en su perfil volátil (15). Por ejemplo, el mango, que se considera una fuente rica en vitamina A, es también conocido por su alto contenido en monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos volátiles oxigenados (aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas) (1). Además, los compuestos principales

señalados para el aroma del mango incluyen 3-careno, limoneno,  $\alpha$ -pineno, p-cimeno, acetaldehído, etanol y hexanal (16).

Para el caso del maracuyá (también conocida como fruta de la pasión), se han reportado diferentes ésteres (lineales, ramificados y sustituidos), tales como butanoato de etilo, hexanoato de etilo y hexanoato de 2-metilbutilo (17) como componentes característicos de esta fruta. Los alcoholes superiores, como el hexanol y el 2-heptanol, que constituyen una fuente importante de aromas florales y verdes, representan el segundo grupo químico más significativo que ha sido identificado en esta fruta. Los terpenos, como el  $\beta$ -ocimeno, también participan de manera significativa en el aroma característico de la fruta de la pasión. Otros grupos químicos menores incluyen cetonas, éteres, hidrocarburos y fenoles (14,18).

Por último, el perfil volátil de la piña muestra que los principales compuestos volátiles son los ésteres, como acetato de etilo, butanoato de etilo o hexanoato de etilo (coincidiendo así con el maracuyá), seguido en menor medida por terpenos, alcoholes y cetonas (8). De hecho, el acetato de etilo se asocia directamente con la presencia de esta fruta (19).

### **1.3. Análisis de compuestos orgánicos volátiles en frutas**

La introducción de frutas tropicales en los mercados europeos está limitada por la baja calidad de algunas de las frutas importadas cuando llegan al país de destino, aspecto que finalmente afecta a la aceptación por parte del consumidor (20). Así determinados factores como el color y la firmeza de la fruta, o el pH, son de importancia en lo que respecta a esta aceptación visual y sensorial. Resulta asimismo de importancia el conocer el perfil de aroma y los VOCs presentes en las frutas, de cara a su control de calidad (15).

Los métodos de prueba directos, como la determinación del color o la firmeza de las frutas, o los experimentos de panel de sabor (sobre todo dulzor y acidez), se vuelven inviables cuando se dispone de elevadas cantidades de muestra. Como métodos analíticos alternativos para mejorar este control de calidad de las frutas tropicales, se ha propuesto el análisis de la fracción volátil de estas frutas.

Los métodos analíticos para la determinación de VOCs suelen implicar la separación, identificación y determinación cualitativa y/o cuantitativa de sus componentes. El número de VOCs identificados en los alimentos depende de la técnica de separación/identificación utilizada. Debido a su naturaleza volátil o semi-volátil, la

cromatografía de gases (GC) resulta de elevada importancia en este tipo de determinaciones analíticas (13).

La mayoría de los estudios de monitorización de VOCs en alimentos utilizan GC en combinación con la espectrometría de masas (MS) (21,22). Con esta técnica, se pueden alcanzar límites de detección del orden de  $0,1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . Las técnicas de GC multidimensional acopladas a MS (GC×GC-MS) también se han empleado para realizar estudios integrales de la composición volátil de alimentos (23,24). A pesar de que GC-MS sea la técnica más utilizada para el análisis de compuesto volátiles en diferentes matrices, existen otras técnicas alternativas que se usan con este propósito, tales como la GC con detección de ionización en llama (GC-FID) (25,26) o la GC con detección por olfactometría (GC-O) (26). Para poder realizar los análisis, ya sea con las muestras en forma fresca o liofilizada, las frutas deben ser (pre)tratadas para extraer y/o preconcentrar los VOCs presentes, eliminando, de ser posible, otras especies interferentes que puedan estar presentes en la matriz de la muestra. Las técnicas analíticas principales de pretratamiento de muestras para el análisis de VOCs son: la extracción en fase sólida (SPE) (27) la extracción asistida con barritas agitadoras sorbentes (SBSE) (28) y microextracción en fase sólida (SPME) (29). Todas estas técnicas se basan en el empleo de un material sólido como extractante (o un líquido muy viscoso anclado en un soporte sólido). La extracción de los analitos de interés se consigue por el establecimiento de un equilibrio de reparto de los analitos desde la muestra inicial (o una disolución o suspensión acuosa de la misma) hasta el material sorbente. Sin embargo, estas técnicas se realizan empleando dispositivos diferentes, tal y como se esquematiza en la Figura 1.

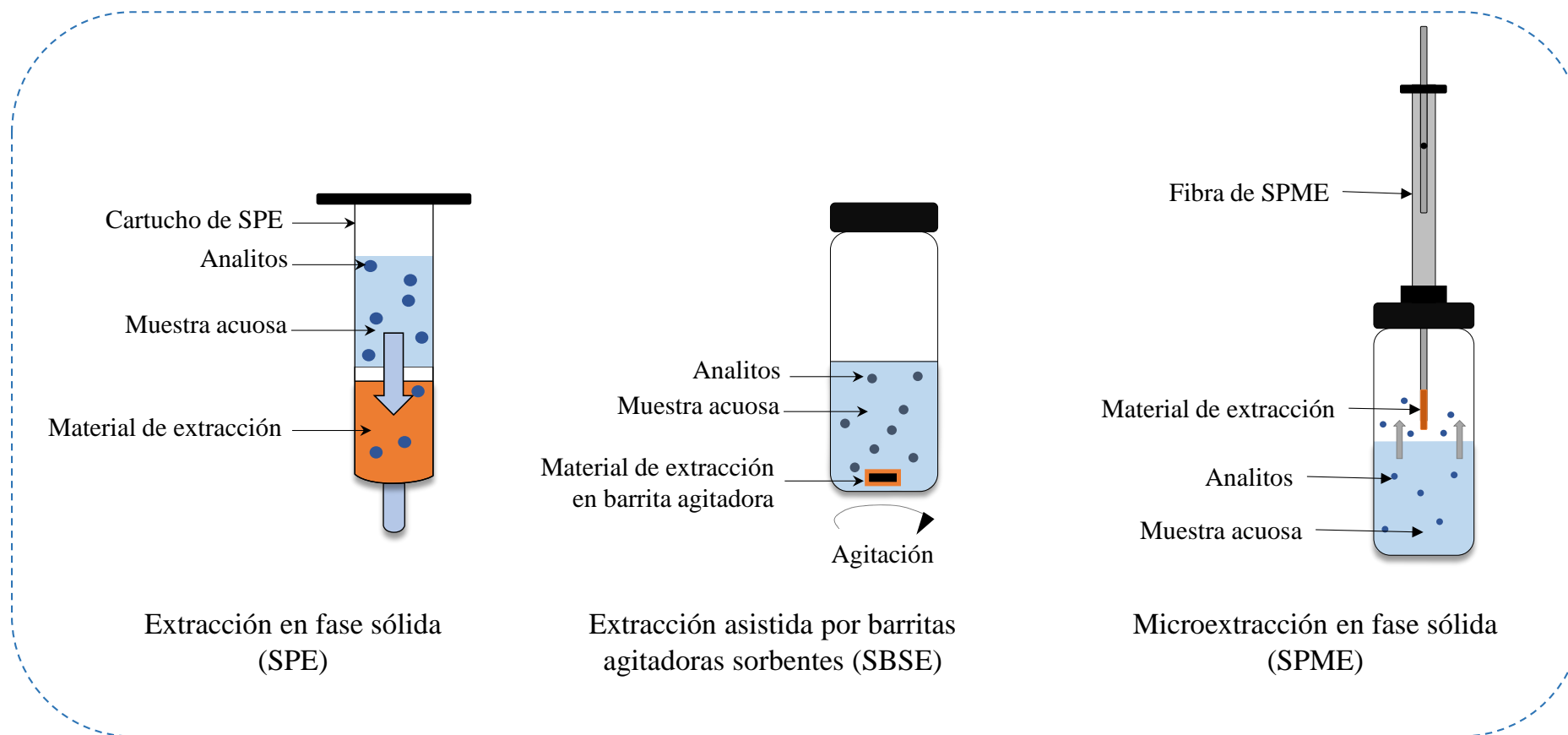
La SPE es una técnica de preparación de muestras sencilla que, cuando se realiza en su configuración más convencional, se basa en el empleo de un cartucho en el que se dispone el material de extracción, con un procedimiento en el que se pueden distinguir dos etapas: la extracción y la elución. En la etapa de extracción, la muestra se hace fluir a través del cartucho que contiene el material extractante. Tras esto, se pueden realizar etapas de lavado o secado del cartucho, con el objetivo de minimizar la presencia de interferentes o mejorar la retención de los compuestos de interés. En la etapa de elución, se hace pasar por el cartucho un volumen determinado de disolvente orgánico. Los analitos que se encuentran retenidos en el material del cartucho, de nuevo experimentan un reparto entre estas dos fases, de forma que al final son eluidos por el disolvente. Esta técnica resulta fácil, económica y automatizable. Además, existe gran variedad de materiales para SPE disponibles comercialmente, o sintetizados en el laboratorio,

incluyendo fases en modo reverso, modo normal, de intercambio iónico, de adsorción, de interacción hidrofílica (HILIC), etc. La principal desventaja es el relativamente elevado volumen de muestra y de disolventes orgánicos necesario para realizar la elución de los analitos. En este sentido, las técnicas de microextracción (tanto la SBSE como la SPME) son más atractivas, porque los requerimientos de muestra y de disolventes son menores (30).

La SBSE emplea una barra de agitación magnética recubierta con una capa de material extractante para la retención de los analitos de interés. La mayor parte de las aplicaciones emplean polidimetilsiloxano (PDMS) como material de extracción. Estas barritas se encuentran disponibles comercialmente y se denominan Twister (Gerstel) (31). El procedimiento de SBSE consta también de dos etapas: la extracción y la desorción. La etapa de extracción se realiza introduciendo directamente el dispositivo en la muestra (DI-SBSE) o en espacio en cabeza de la disolución (HS-SBSE) y mediante agitación durante un tiempo determinado. La desorción de los analitos extraídos en la barrita se realiza poniéndola en contacto con un pequeño volumen de disolvente (desorción líquida) o aplicando altas temperaturas en un sistema de desorción térmica. La SBSE resulta una técnica altamente sensible debido al relativamente elevado volumen de fase polimérica, especialmente en comparación con otras técnicas de microextracción, y con la que se pueden alcanzar altos factores de enriquecimiento de los analitos gracias a la diferencia de volúmenes entre muestra y material de extracción. Sin embargo, presenta otra serie de desventajas: el requerimiento de elevados tiempos de extracción para llegar a condiciones de equilibrio, la posibilidad de daño o ruptura del material de la barrita durante la extracción debido a la agitación y la presencia de efecto memoria o *carry-over* significativo (32).

La SPME utiliza como sistema de extracción una pequeña cantidad de material de extracción en forma de fibra. Este sistema se monta en un dispositivo que se asemeja al de una micro-jeringa para realizar la extracción (33). Esta técnica se discutirá en detalle la siguiente sección por sus ventajas y su uso extensivo para el análisis de VOCs en alimentos.





**Figura 1.** Esquema de los dispositivos empleados en las principales técnicas de extracción de VOCs en alimentos.

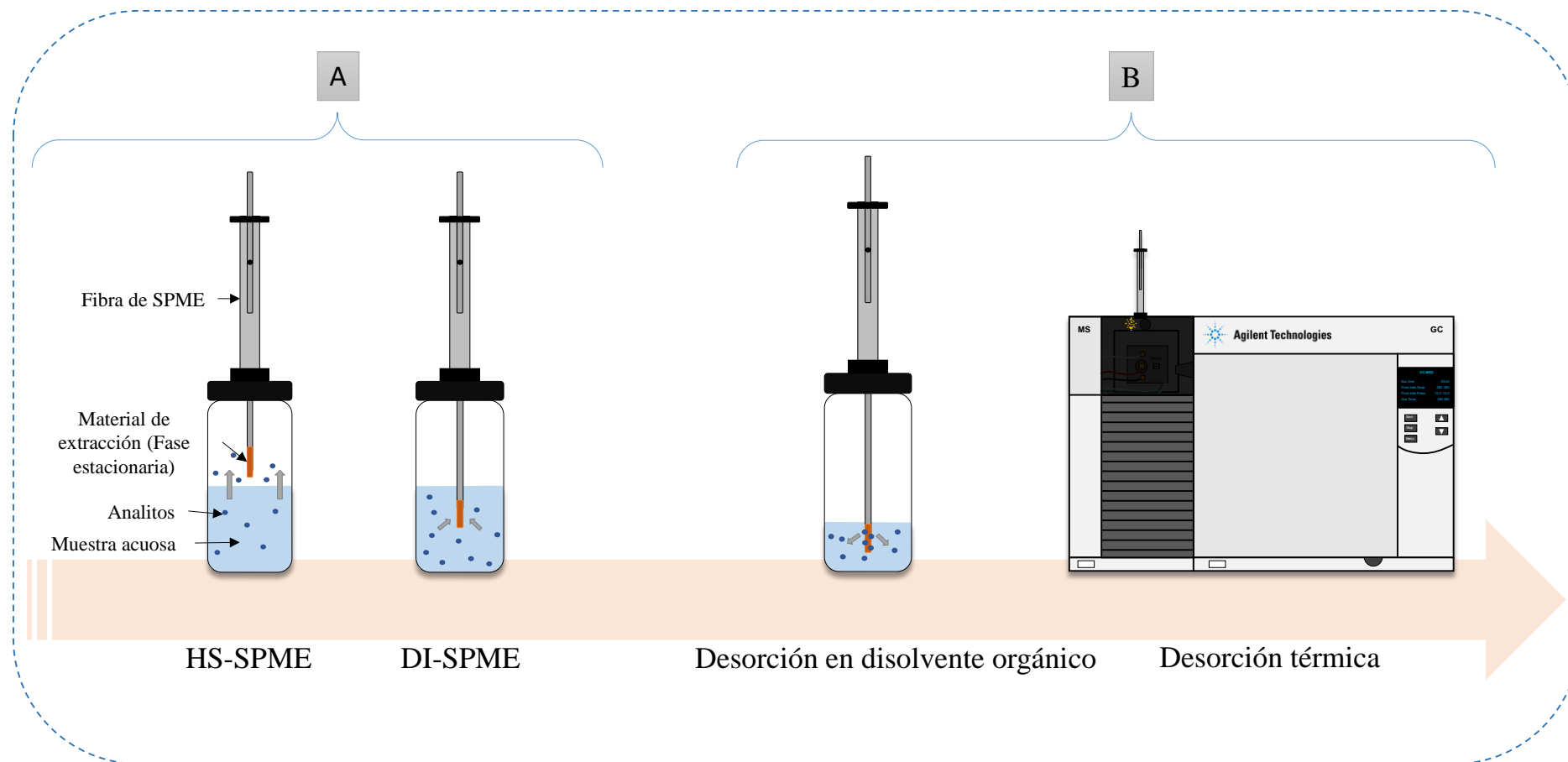
#### 1.4. Microextracción en fase sólida

La SPME fue desarrollada por Pawlizyn en 1990 (34) como una alternativa a la SPE. Sin embargo, la SPME no es la técnica miniaturizada directa de la SPE pues emplea como material de extracción el recubrimiento en forma de fibra en lugar de un cartucho relleno del material de extracción. Además, los requerimientos de muestra y de material extractante en SPME son menores que en SPE, con volúmenes de 20 mL de muestra o inferiores y menos de 1  $\mu$ L de material sorbente cuando se trata de un líquido viscoso (y unos pocos  $\mu$ g cuando se trata de un material sólido), frente a los volúmenes de muestra superiores a 250 mL en SPE, y materiales de extracción de 1 g o superiores.

El procedimiento de SPME se realiza también en dos etapas: extracción y desorción, como en SBSE. La Figura 2 muestra un esquema de dicho procedimiento. Durante la etapa de extracción, existen dos modos de trabajo principales que se clasifican según la forma en que se expone el material extractante a la muestra. Así, se diferencia entre DI-SPME y HS-SPME en base a si la fibra se expone directamente a la muestra acuosa o si se coloca en el espacio superior del vial de extracción (HS) (ver Figura 2 (A)).

La HS-SPME es especialmente útil para la determinación de VOCs (35). En este caso, se establece un sistema con tres fases: la muestra acuosa, en la que inicialmente se encuentran los analitos, el HS, y el recubrimiento activo de la fibra de SPME. Durante la extracción, los analitos experimentan reparto entre estas fases. En la mayoría de los casos, el paso limitante y que determina el tiempo de equilibración de los analitos es el paso al HS. Por ello, el estudio de variables como la temperatura de extracción o la fuerza iónica de la muestra, que pueden acelerar o decelerar este paso, es de vital importancia en HS-SPME.

Independientemente de la modalidad de extracción (DI- o HS-SPME), existen dos mecanismos de extracción distintos: absorción y adsorción (33). En la absorción, se produce una difusión rápida de los analitos en la fibra, llegando incluso a las capas internas del recubrimiento de SPME. En la adsorción, la extracción se realiza con fibras porosas, en las que los analitos quedan adheridos a la superficie de los poros. Las fibras comercializadas que extraen siguiendo un mecanismo de absorción son las basadas en poliacrilato (PA), y se utiliza para analitos polares (por ejemplo, los fenoles) y la PDMS, para analitos apolares (por ejemplo, el tolueno). Las fibras en las que se combina más de un polímero como la carboxen-PDMS (CAR-PDMS) o divinilbenzeno/CAR-PDMS (DVB/CAR-PDMS) son más adecuadas para analitos volátiles y extraen mediante adsorción (33,36,37).



**Figura 2.** Modos de (A) extracción y (B) desorción en el proceso de SPME

Una vez finalizada la extracción, la etapa de desorción puede ser de dos tipos: desorción térmica y desorción con disolvente orgánico (ver Figura 2 (B)). La desorción térmica es indicada cuando se emplea GC como técnica posterior de separación de los analitos. Esta modalidad se basa en la introducción de la fibra de SPME en el inyector del cromatógrafo, el cual se encuentra a elevadas temperaturas. En la desorción con disolvente orgánico, la fibra se expone a un volumen pequeño de disolvente (inferior a 1 mL), el cual es posteriormente inyectado en el instrumento de análisis, que puede ser cromatografía líquida (LC), GC, o electroforesis capilar (CE).

La SPME presenta diversas ventajas como técnica de microextracción. En primer lugar, aunque es una técnica no exhaustiva, se alcanzan elevados niveles de preconcentración debido a los pequeños volúmenes de material de extracción empleados. Además, al controlar la polaridad y el grosor del revestimiento de la fibra y otros parámetros de extracción, como el tiempo, se garantizan resultados altamente consistentes y cuantificables, libres de efecto memoria. Esta técnica no destructiva para las muestras es fácilmente automatizable y aplicable a cualquier matriz de diferente naturaleza ya sea gaseosa, líquidas o sólida, siendo las fibras reutilizables, económicas y compatibles con diferentes tipos de instrumentación analítica.

El principal inconveniente que presenta es la limitada capacidad de las fibras, ya que la cantidad de recubrimiento es muy pequeña. Como consecuencia de ello, en algunas aplicaciones, sobre todo en SPME-LC, la sensibilidad puede ser limitada, lo que ha derivado en otras modalidades de microextracción como la que utiliza películas delgadas.

#### ***1.4.1. Importancia la determinación de VOCs mediante HS-SPME***

Existen dos tipos de problemas principales en lo que respecta a la determinación de VOCs en muestras de alimentos: problemas relativos a los analitos y otros relacionados con las muestras. Por una parte, los VOCs poseen gran variedad de polaridades, reactividades y funcionalidades, y se encuentran presentes en las muestras de alimentos en cantidades variables, desde grandes cantidades a niveles traza (38). Por ello, se requiere de materiales de extracción que sean sensibles para analitos de diversa naturaleza. Además, las muestras analizadas son altamente complejas, por lo que la técnica de extracción debe además servir como etapa de limpieza. Del mismo modo, el material de extracción debe ser estable o disponerse de forma que no sea dañado durante el tratamiento de la muestra. Por todo lo mencionado, actualmente, la HS-SPME es la técnica más utilizada para obtener el perfil de VOCs en muestras de alimentos (38). Como

ejemplos, conviene destacar el análisis de muestras de café (39), vino (40), quesos (41), papas (42) y frutas como fresa (43), naranja (44), melón (45), piña (46), maracuyá (47) o mango (14).

En lo que respecta al análisis de volátiles en frutas mediante HS-SPME, es común el análisis del jugo de las frutas (con o sin pulpa) en lugar de la piel, que es la mayoría de las ocasiones la parte del alimento que llega al consumidor. La Tabla 3 muestra ejemplos de métodos de HS-SPME-GC-MS para la determinación de VOCs en muestras de jugos de piña (46,48,49), maracuyá (14,17,50,51) y mango (47,52-54). Las fibras de SPME empleadas fueron CAR-PDMS (46-48,50), DVB-PDMS (49,51) y DVB/CAR-PDMS (14,17,52-54). La mayor parte de métodos desarrollados realizan estudios de tipo cualitativo (14,17,46-48,51,53,54) y se basan en la identificación del perfil volátil de las muestras empleando diferentes métodos, incluyendo: la comparación del tiempo de retención cromatográfico mediante la inyección de los correspondientes estándares, la correlación del espectro de masas con espectros de librerías, o la determinación del índice de Kovats. Algunos estudios emplearon análisis multivariante para evaluar el efecto de parámetros postcosecha en el perfil volátil de la muestra piña (49). Con respecto a estudios más cuantitativos, por ejemplo, Sam et al. cuantificaron un total de 7 analitos en mango, con contenidos entre 290 y 4102  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (52).

**Tabla 3.** Ejemplos representativos de la determinación de VOCs en muestras de jugos de frutas de piña, maracuyá y mango mediante HS-SPME-GC-MS.

<i>Fruta tropical</i>	<i>N° total de VOCs identificados</i>	<i>N° ésteres y/o terpenos</i>	<i>Cantidad de muestra (tipo)</i>	<i>Fibra de SPME</i>	<i>Tipo de análisis</i>	<i>Ref.</i>
Piña	34	24 ésteres	0,55 g (pulpa)	CAR-PDMS	Cualitativo	(46)
Piña	52	36 ésteres y 3 terpenos	8 g (jugo)	CAR-PDMS	Cuantitativo	(48)
Piña	142	88 ésteres	110 g (pulpa)	DVB-PDMS	Semicuantitativo	(49)
Maracuyá	169	88 ésteres y 21 terpenos	5 g (pulpa)	DVB/CAR-PDMS	Cualitativo	(14)
Maracuyá	42	26 ésteres y 11 terpenos	4 g (pulpa)	CAR-PDMS	Semicuantitativo	(50)
Maracuyá	44	26 ésteres y 8 terpenos	0,2 mL (jugo)	DVB-PDMS	Cualitativo	(51)
Maracuyá	148	44 ésteres y 20 terpenos	3 g (pulpa)	DVB/CAR-PDMS	Cualitativo	(17)
Mango	35	3 ésteres y 10 terpenos	7 mL (jugo)	CAR-PDMS	Cualitativo	(47)
Mango	70	7 ésteres y 14 terpenos	5 mL (jugo)	DVB/CAR-PDMS	Cualitativo	(53)
Mango	47	-	2,5 g (pulpa)	DVB/CAR-PDMS	Cualitativo	(54)
Mango	7	1 éster y 5 terpenos	2,5 g (pulpa)	DVB/CAR-PDMS	Cuantitativo	(52)

## 2. Objetivos

La monitorización de VOCs en frutas tropicales resulta de enorme interés para incrementar la información nutricional y organoléptica de las mismas, lo que permitiría la mejora en la producción y la aceptación del alimento por parte del consumidor. Pese a que se encuentran disponibles una gran variedad de estudios que analizan VOCs en alimentos, existe un limitado número en lo que respecta a frutas tropicales. Además, la mayoría de los estudios con estos fines son de tipo cualitativo, centrándose en la identificación de los componentes presentes en las muestras analizadas, pero no en el contenido de los mismos.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de un método de HS-SPME-GC-MS para la monitorización cualitativa y cuantitativa de VOCs presentes en jugos de frutas tropicales de piña, maracuyá y mango, cultivadas en las Islas Canarias.

En base al objetivo principal anteriormente descrito, se han definido asimismo los siguientes objetivos parciales:

- La elección de un grupo de VOCs característicos de la muestra de interés mediante una búsqueda bibliográfica en bases de datos científicas.
- La optimización de la separación analítica por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas usando dos instrumentos diferentes, con analizador másico cuadrupolar simple (GC-QMS) y con triple cuadrupolo (GC-QQQMS).
- La puesta a punto y optimización de un método de HS-SPME como etapa de tratamiento de las muestras, con estudios centrados tanto en la selección de la fibra comercial ideal para la determinación de los analitos seleccionados, así como en la realización de un diseño experimental enfocado a la obtención de las condiciones óptimas de extracción para la fibra previamente seleccionada.
- El análisis cualitativo del perfil de VOCs de tres jugos de frutas tropicales representativos de Canarias: piña, maracuyá y mango.
- El análisis cuantitativo de las muestras de jugos de frutas tropicales, que necesariamente requiere de la validación de la metodología seleccionada (HS-SPME-GC-QQQMS), con especial atención al estudio del efecto matriz.

Además, este trabajo se incluye dentro de la asignatura de Trabajo de Fin de Máster del Máster en Química especializado en Química Medioambiental,

Agroalimentaria y Materiales. Por lo tanto, se han fijado los siguientes objetivos transversales para la superación de la asignatura:

- El manejo de diferentes fuentes de información y bases de datos científicas a través de la búsqueda bibliográfica sobre metodologías de análisis de VOCs en diferentes alimentos.
- La aplicación de los fundamentos teóricos adquiridos en el Máster en Química, especialmente los relacionados con técnicas de microextracción ,separaciones cromatográficas y quimiometría. La toma de decisiones relacionadas con el proyecto de investigación.
- El desarrollo de la creatividad y habilidades de pensamiento crítico y reflexivo.



### **3. Experimental**

#### **3.1. Reactivos, disolventes, disoluciones y muestras**

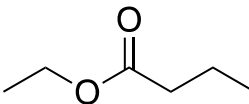
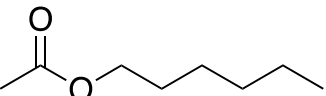
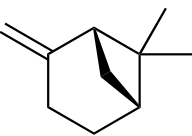
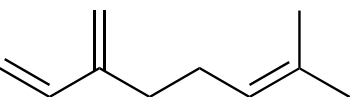
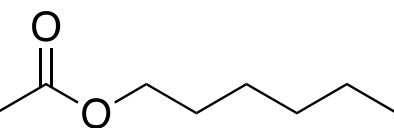
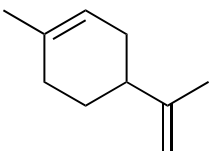
Entre los analitos estudiados se encuentran cinco ésteres y cinco terpenos, todos con una pureza superior al 97% y suministrados por Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Steinheim, Alemania). La Tabla 4 contiene las estructuras químicas y algunas de las propiedades físico-químicas más significativas de los analitos estudiados.

Se utilizó metanol proporcionado por Honeywell Fluka™ (Seetze, Alemania) para preparar disoluciones estándares individuales de cada analito a una concentración de 2000 mg·L<sup>-1</sup>. A partir de las disoluciones estándares, se preparó una disolución estándar intermedia conteniendo todos los analitos a 20 mg·L<sup>-1</sup> en metanol. Esta disolución intermedia se utilizó en la optimización del método cromatográfico y del método de extracción, así como para la construcción de las curvas de calibrado. Todas las disoluciones estándar se conservaron protegidas de la luz y refrigeradas en nevera a 4 °C. Las disoluciones estándares de trabajo se prepararon por dilución de la disolución intermedia en diferentes medios acuosos. El contenido de metanol en todos los casos (en estas disoluciones de trabajo) fue igual o inferior al 0,8 % (v/v).

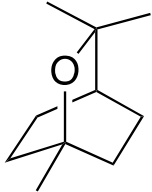
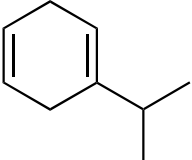
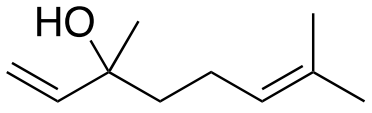
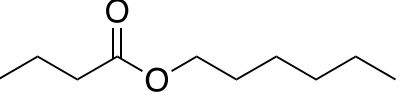
Para la preparación de las disoluciones de trabajo durante la optimización del método analítico, se utilizó agua ultrapura (18,2 MΩ·cm<sup>-1</sup>) obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Watford, UK) y NaCl suministrado por Sigma-Aldrich/Merck KGaA.

Las muestras de jugo de frutas tropicales fueron suministradas por el Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife). La Tabla 5 incluye el tipo de fruta tropical, su procedencia o cultivar y las abreviaturas utilizadas en este estudio. El jugo de las frutas fue extraído y congelado en nitrógeno líquido a -80 °C hasta la realización de los análisis.

**Tabla 4.** Fórmula, estructura química y algunas características físico-químicas de los analitos estudiados.

<i>Analito</i> ( <i>abreviatura</i> )	<i>Fórmula</i>	<i>Estructura</i>	<i>Peso molecular</i> ( <i>g·mol<sup>-1</sup></i> )	<i>T<sub>eb</sub></i> (°C)	<i>Presión de vapor (Pa) a 25°C</i>
Butanoato de etilo (EB)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>		116,16	121	18532
Acetato de butilo (BA)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>		116,16	126	15332
(-)- $\alpha$ -Pino (Pin)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		136,23	157	46530
Mirceno (Myr)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		136,23	136	30531
Acetato de hexilo (HA)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>		144,21	172	18532
Limoneno (Limo)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		136,23	175	20532

**Tabla 4.** (continuación).

<i>Analito</i> (abreviatura)	<i>Fórmula</i>	<i>Estructura</i>	<i>Peso molecular</i> (g·mol <sup>-1</sup> )	<i>T<sub>eb</sub></i> (°C)	<i>Presión de vapor (Pa) a 25°C</i>
Eucaliptol (Eu)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>		116,16	126	21998
Terpineno (Ter)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		136,23	183	14399
Linalol (Lina)	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		154,25	199	12132
Butanoato de hexilo (HB)	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>		172,26	208	31064

Nota: Los datos de esta tabla fueron obtenidos en la base de datos SciFinder Scholar© (American Chemical Society 2021).

**Tabla 5.** Abreviaturas, tipo de fruta y procedencia o cultivar de las frutas tropicales analizadas en este estudio.

<i>Abreviatura</i>	<i>Tipo de fruta</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Procedencia o cultivar</i>
Piña RE	Piña	<i>Ananas comusus</i> Merr.	Cultivar Roja Española
Piña MD	Piña	<i>Ananas comusus</i> Merr.	Cultivar MD2
Maracuyá	Maracuyá	<i>Passiflora edulis</i> Sims	Maguary
Mango	Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	Keit

### 3.2. Materiales

Las fibras de SPME comerciales empleadas en este trabajo fueron suministradas por Supelco (Bellefonte, Estados Unidos) y tienen las características mostradas en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características de los recubrimientos de SPME empleados en este estudio.

<i>Tipo de recubrimiento (Abreviatura)</i>	<i>Grosor fibra (<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Naturaleza del analito a extraer</i>
Polidimetilsiloxano PDMS	100	No polar
Divinilbenzeno-Polidimetilsiloxano DVB-PDMS	65	Polar y volátil
Carboxen-Polidimetilsiloxano CAR-PDMS	75	Polar y volátil
Divinilbenzeno/Carboxen-Polidimetilsiloxano DVB/CAR-PDMS	50/30	Semipolar

Las experiencias de extracción mediante HS-SPME se llevaron a cabo utilizando viales topacio de 10 mL de capacidad, con tapones y septum suministrados por Agilent Technologies (Santa Clara, Estados Unidos). Además, se emplearon barritas agitadoras de 10 mm  $\times$  4,5 mm suministradas por Sigma-Aldrich/Merck KGaA, un agitador magnético con placa calefactora de IKA<sup>®</sup> WERKE RCT basic (Staufen, Alemania) controlado con un termostato Sensoterm II suministrado por JP Selecta (Barcelona, España) y un soporte metálico para la sujeción de las fibras adquirido en Supelco (Sigma-Aldrich/Merck KGaA).

Las micropipetas de trabajo, con rangos de 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 1-10 mL, fueron suministradas por Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y Thermo Scientific (Massachusetts, Estados Unidos).

### 3.3. Instrumentación

Se emplearon dos instrumentos de GC-MS diferentes durante el transcurso del trabajo. Para la optimización del método de HS-SPME se usó un GC 7820A con detector de espectrometría de masas (MS) modelo 59778 con sistema de ionización por impacto electrónico (EI) y con un analizador másico cuadrupolar simple (Q).

Por su parte, para la validación del método y análisis de muestras, se empleó un GC modelo 8890B de Agilent Technologies equipado con un detector MS 7000D. El MS está formado por un sistema EI y un analizador másico cuadrupolar triple (QQQ).

Tanto en GC-QMS como en GC-QQQMS, la columna cromatográfica utilizada fue la HP-5MS UI (30 m  $\times$  0,250 mm  $\times$  0,25  $\mu\text{m}$  de grosor de recubrimiento), suministrada por Agilent Technologies. La adquisición de datos se realizó con el software MassHunter Workstation (Agilent Technologies).

Para el tratamiento de datos se usaron los siguientes softwares: (1) Microsoft Office Word v. 2016 para la redacción de la memoria, (2) Microsoft Office Excel v. 2016 para el tratamiento estadístico y elaboración de gráficos, (3) Microsoft Office PowerPoint v. 2016 para la elaboración de figuras, (4) Statgraphics Centurion XV.I para el desarrollo del plan de screening, obtención de superficies de respuesta y optimización multivariante y (5) la librería NIST v. 2014 para realizar el análisis cualitativo de los jugos de las frutas tropicales señaladas.

### 3.4. Procedimientos

#### 3.4.1. Procedimiento de extracción-desorción mediante HS-SPME

El procedimiento de HS-SPME realizado en este TFM hace uso de 5 mL de una disolución acuosa (o muestra de jugo) de fruta tropical que se ubica en el vial de extracción, conteniendo NaCl (cuya cantidad fue objeto de optimización), junto a una barrita agitadora magnética. El vial se somete entonces a agitación durante 1 min a temperatura ambiente, para disolver completamente la sal y asegurar la homogenización, y se coloca en el termobloque metálico que se encuentra en la placa calefactora. A continuación, la fibra de SPME se introduce en el vial a través del septum sin que se sumerja en la disolución (para asegurar el modo de trabajo en HS). Para la extracción en

las condiciones optimizadas, la fibra óptima (DVB/CAR-PDMS) se expone inmediatamente al espacio en cabeza de la disolución durante 60 min a 60 °C y 500 rpm. Otras condiciones fueron utilizadas durante el proceso de optimización.

Tras ello, la fibra se retira del vial y la desorción térmica de los analitos se realiza introduciendo la fibra de SPME en el inyector del GC durante 6 min y empleando la temperatura de desorción recomendada por el fabricante para cada fibra, que se corresponde con la temperatura máxima de estabilidad del recubrimiento. Así, se usó 280 °C para PDMS, 310 °C para CAR-PDMS, 270 °C tanto para DVB-PDMS como DVB/CAR-PDMS. Asimismo, se realizó una limpieza inicial de las fibras al comenzar cada día de trabajo que consistió en introducir la fibra de SPME durante 15 min en el inyector de GC a la temperatura anteriormente indicada.

### 3.4.2. Separación y detección de los analitos en GC-MS

Tanto para los experimentos de GC-QMS, como para los de GC-QQQMS, se emplearon diferentes temperaturas en el inyector en base a la temperatura de desorción de cada fibra (ver Sección 3.4.1). Además, la inyección se realizó en modo *splitless*, con un *split vent* a los 6 min a razón de 15 mL·min<sup>-1</sup>. La separación cromatográfica se realizó usando He como gas portador a 1 mL·min<sup>-1</sup>. Para la ionización y detección por MS, se empleó una energía de 70 eV en el EI y 280 °C, 250 °C y 150 °C como temperaturas en la línea de transferencia, fuente de ionización y cuadrupolo. Además, se usó un modo dual SCAN/SIM en ambos casos. Las Tablas 7 y 8 muestran las separaciones en el GC y el programa de segmentos en el MS empleado en GC-QMS y GC-QQQMS, respectivamente.

En el caso de las experiencias mediante GC-QQQMS, se usó un flujo adicional de He (quencheante) a 2,25 mL·min<sup>-1</sup> y un flujo de N<sub>2</sub> a 1,5 mL·min<sup>-1</sup> en el segundo cuadrupolo (celda de colisión). Además, se empleó el primer cuadrupolo para el modo SCAN y el tercer cuadrupolo en modo SIM.

**Tabla 7.** Programa de temperaturas y de segmentos de iones monitorizados en la separación y detección por GC-QMS.

<i>Segmento</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura<sup>a</sup> (°C)</i>	<i>Rampa de temperatura (°C·min<sup>-1</sup>)</i>	<i>Mantenimiento de la temperatura (°C)</i>	<i>Iones monitorizados<sup>b</sup> (m/z)</i>
1: EB, BA	0	60	2	1	71, 43, 88, 43, 56, 41, 73
2: Pin	4,5	-		-	93, 91, 92
3: Myr	6	-		-	41, 93, 55, 43
4: HA	7,8	-		-	43, 56, 55, 61
5: Limo, Eu	8,5	-		-	68, 93, 67, 79, 43, 81, 108, 71
6: Ter	9,8	-		-	93, 91, 136, 121
7: Lina	11,5	-		-	71, 93, 55, 43
8: HB	16	-		-	43, 71, 89, 56
9:	31	120	8	-	-
10:	59	320		3	-

\* Se programó el modo SCAN en el intervalo de masa de 40-250 (m/z).

<sup>a</sup> Temperatura en el horno de la columna.

<sup>b</sup> Iones monitorizados en cada segmento del programa SIM.

**Tabla 8.** Programa de temperaturas y de segmentos de iones monitorizados en la separación y detección por GC-QQQMS.

<i>Segmento</i>	<i>Tiempo (min)</i>	<i>Temperatura<sup>a</sup> (°C)</i>	<i>Rampa de temperatura (°C·min<sup>-1</sup>)</i>	<i>Mantenimiento de la temperatura (°C)</i>	<i>Iones monitorizados<sup>b</sup> (m/z)</i>
1: EB, BA	0	60	2	3	71, 43, 88, 43, 56, 41, 73
2: Pin	4,5	-		-	93, 91, 92
3: Myr	8	-		-	41, 93, 55, 43
4: HA	9,1	-		-	43, 56, 55, 61
5: Limo, Eu	10,2	-		-	68, 93, 67, 79, 43, 81, 108, 71
6: Ter	11,7	-		-	93, 91, 136, 121
7: Lina	14	-		-	71, 93, 55, 43
8: HB	17	-		-	43, 71, 89, 56
9:	43	140	20	-	-
10:	54	300		3	-

\* Se programó el modo SCAN en el intervalo de masa de 40-250 (m/z).

<sup>a</sup> Temperatura en el horno de la columna.

<sup>b</sup> Iones monitorizados en cada segmento del programa SIM.



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Optimización de métodos de GC-MS

#### 4.1.1. GC-QMS

Las condiciones óptimas que aseguraron la separación y correcta detección de los analitos estudiados se indicaron en la Tabla 7 del procedimiento experimental. El tiempo total de análisis en el GC-QMS fue de 59 min. La Tabla 9 muestra el orden de elución de los analitos junto con sus tiempos de retención. En general, cuando se emplea como sistema de detección la MS, el poder de resolución de la técnica de GC aumenta y, en multitud de ocasiones, no resulta necesario alcanzar la separación completa de los analitos, puesto que la MS permite posteriores diferenciaciones. Sin embargo, en esta aplicación concreta fue necesario asegurar la correcta separación de todos analitos usando el modo SCAN, ya que muchos de ellos poseen una naturaleza similar, generando así fragmentos pequeños y muy similares en el espectro MS. En este sentido, una vez separados, se optimizó el programa SIM, dividiendo el cromatograma en segmentos o grupos de analitos que eluían a tiempos de retención similares, seleccionándose los iones con masa/carga ( $m/z$ ) adecuados para poder realizar una correcta identificación. Para seleccionar el ion  $m/z$  cuantificador, se empleó el cromatograma del SCAN en condiciones de separación óptimas, extrayéndose el espectro de masas al tiempo de retención de cada analito y con las siguientes consideraciones adicionales: (a) selección de aquel ion con mayor relación  $m/z$  y la mayor intensidad en el espectro posible, (b) selección del ion  $m/z$  con poco ruido en el espectro y (c) selección de aquel ion  $m/z$  que, aun no cumpliendo los criterios anteriores, permita la diferenciación con respecto a otros analitos. Con respecto a los criterios para la identificación de los analitos, se utilizó: su tiempo de retención, la presencia de varios iones  $m/z$  (el cuantificador y 1–3 iones cualificadores, de acuerdo con los criterios anteriores y a lo indicado en la Tabla 9, y el valor de la relación del ion cuantitativo respecto de cada ion cualitativo con respecto al que presentan los estándares sometidos a las mismas condiciones de determinación analítica.

Conviene mencionar que se optó por trabajar simultáneamente en SCAN y SIM para obtener información extra sobre la presencia de otros analitos en las muestras de jugos de frutas (a modo de análisis *untargeted*).

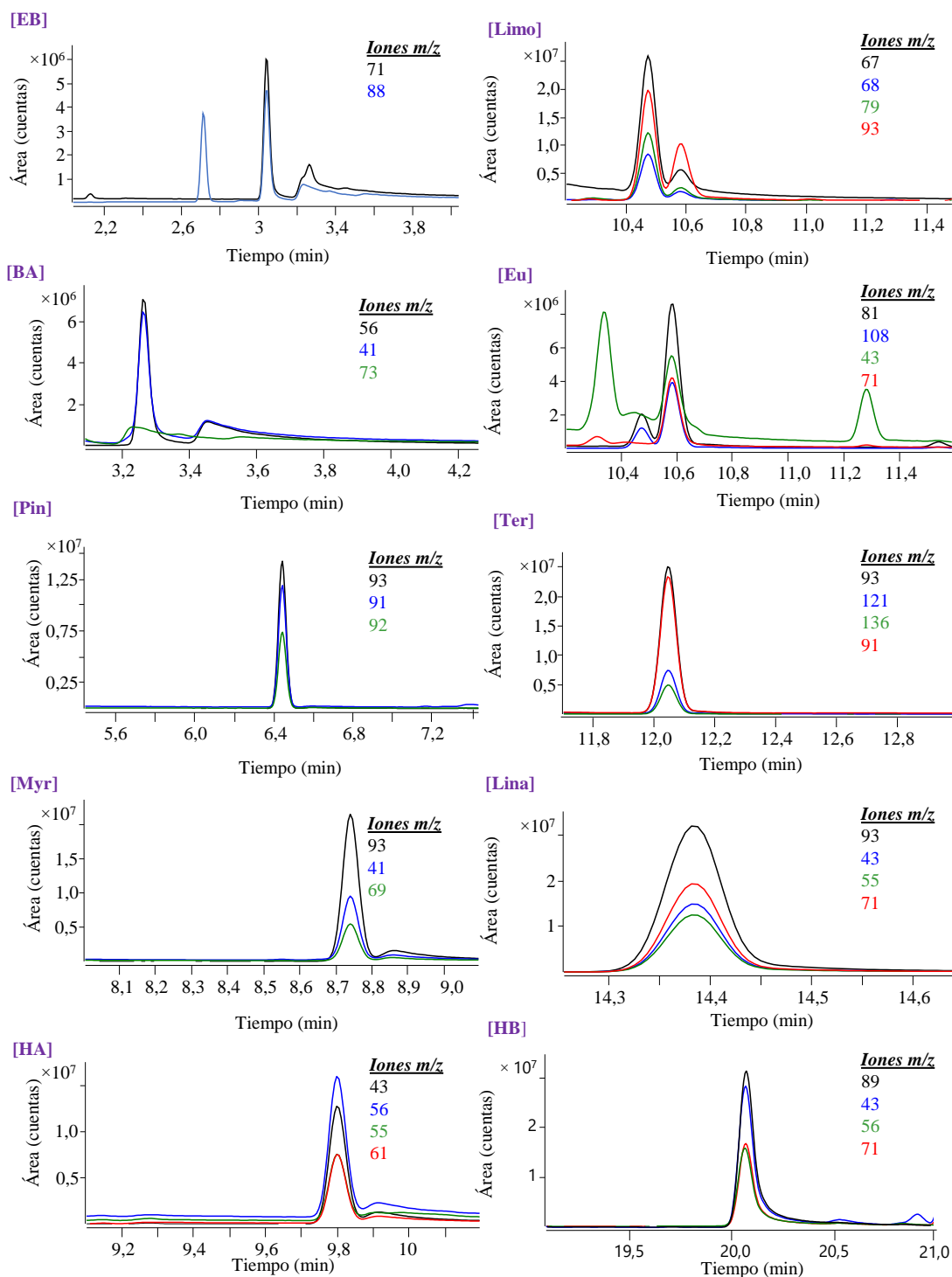
**Tabla 9.** Tiempo de retención e iones cuantificadores y cualificadores seleccionados en la separación de los analitos mediante GC-QMS.

<i>Analito</i>	<i>RT<sup>a</sup> ± SD<sup>b</sup> (min)</i>	<i>Ion cuantificador (m/z)</i>	<i>Iones cualificadores (m/z)</i>		
EB	2,82 ± 0,08	71	88	-	-
BA	2,86 ± 0,03	56	41	73	-
Pin	5,54 ± 0,04	93	91	92	-
Myr	7,44 ± 0,04	93	41	69	-
HA	8,3 ± 0,07	43	55	56	61
Limo	8,65 ± 0,04	67	68	79	93
Eu	8,7 ± 0,3	81	43	71	108
Ter	10,27 ± 0,06	93	91	121	136
Lina	12,35 ± 0,08	93	43	55	71
HB	17,6 ± 0,1	89	56	71	89

<sup>a</sup> Tiempo de retención de analitos.

<sup>b</sup> Desviación estándar del tiempo de retención (n = 30).

El *solvent delay* se fijó a 0 min por las mismas razones (poder registrar el mayor número de analitos en el estudio cualitativo de las muestras) y porque los analitos volátiles y semivolátiles (generalmente presentes en estas muestras) tienen una naturaleza relativamente polar y, por tanto, eluyen rápidamente. En este sentido, la técnica de SPME presenta ventajas cuando se combina con GC-MS ya permite trabajar con *solvent delays* cortos sin dañar los filamentos de la fuente de ionización por presencia de disolvente. Esto se debe a que se trata de una técnica de microextracción sin requerimientos de disolvente (*solvent-free*). De hecho, sólo requiere del empleo de un volumen mínimo de disolvente cuando se trabaja con disoluciones acuosas de estándares. La Figura 3 muestra un cromatograma representativo obtenido en las condiciones de separación óptimas en el modo SIM, donde se observa la abundancia relativa de cada ion m/z para los analitos monitorizados en este estudio.



**Figura 3.** Cromatogramas representativos (modo SIM) obtenidos tras aplicar el método de HS-SPME-GC-QMS a una disolución estándar acuosa conteniendo todos los analitos a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se utilizó la fibra DVB/CAR-PDMS a 60 min. de extracción,  $60^\circ\text{C}$  de temperatura de extracción y 20% (p/v) de NaCl%. Nota: el cromatograma negro se refiere al ion  $m/z$  cuantificador.

#### 4.1.2. GC-QQQMS

Las condiciones de empleo del GC-QQQMS en las condiciones que se detallaron en la Sección 3.4.2 del procedimiento experimental. En lo que respecta a la etapa de separación por GC, se modificó ligeramente la rampa de temperaturas respecto a la empleada en GC-QMS para mejorar la separación en la zona inicial del cromatograma para su mejor implantación en los estudios cualitativos con muestras reales, que es donde se identificará la mayoría de los compuestos volátiles relativos a las frutas tropicales estudiadas. La Tabla 10 muestra los tiempos de retención de los analitos en estas condiciones, siendo el tiempo total de análisis 54 min.

**Tabla 10.** Tiempo de retención e iones cuantificadores y cualificadores seleccionados en la separación de los analitos mediante GC-QQQMS.

Analito	RT <sup>a</sup> ± SD <sup>b</sup> (min)	Ion cuantificador	Iones cualificadores (m/z)		
		(m/z)			
EB	3,04 ± 0,04	71	88	-	-
BA	3,2 ± 0,2	56	41	73	-
Pin	6,44 ± 0,03	93	91	92	-
Myr	8,73 ± 0,04	93	41	69	-
HA	9,7 ± 0,1	43	55	56	61
Limo	10,48 ± 0,03	67	68	79	93
Eu	10,57 ± 0,05	81	43	71	108
Ter	12,07 ± 0,02	93	91	121	136
Lina	14,37 ± 0,03	93	43	55	71
HB	20,09 ± 0,04	89	56	71	89

<sup>a</sup> Tiempo de retención de analitos.

<sup>b</sup> Desviación estándar del tiempo de retención (n = 30).

Pese a que se empleó triple cuadrupolo como analizador másico, no pudo trabajarse en la modalidad MS/MS ya que los iones m/z mayoritarios detectados en el SCAN en GC-QMS para los analitos monitorizados presentaban iones cuantificadores muy pequeños (con m/z entre 40–90). Así, la fragmentación de estos iones en otros iones

más pequeños para el método de MS/MS carece de utilidad debido a las propias limitaciones del detector.

## 4.2. Optimización del método de HS-SPME

La eficacia de extracción en HS-SPME está influenciada por varios factores procedimentales relacionados tanto con la etapa de extracción como con la de desorción. En este estudio, los parámetros relativos a la desorción fueron fijados en base a los conocimientos teóricos de la técnica (33). Así, como temperatura de desorción se fijó la máxima temperatura que cada fibra de SPME puede admitir sin observar degradación del recubrimiento, de forma que se facilite el paso de los analitos extraídos al inyector en el menor tiempo posible. Estos valores vienen indicados por el fabricante de los recubrimientos de SPME y se detallaron en la Sección 3.4.1 del procedimiento experimental. Por otro lado, como tiempo de desorción se seleccionó un tiempo relativamente largo de 6 min para asegurar que todo el analito fuera liberado de las fibras. Se monitorizó de forma aleatoria la ausencia de *carry-over* o efecto memoria en las fibras realizando una desorción adicional tras la desorción principal, con resultados satisfactorios.

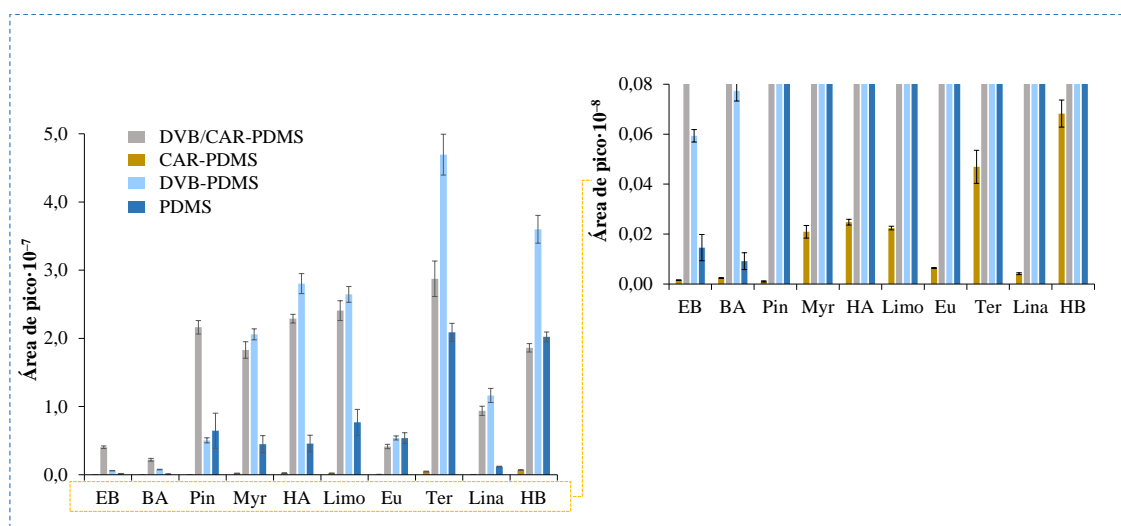
En lo que respecta a la etapa de extracción, se decidió fijar el volumen de muestra a 5 mL, de forma que el espacio en cabeza fuera también 5 mL. Como velocidad de agitación, se seleccionó 500 rpm, que era la velocidad máxima que se podía aplicar sin observar salpicaduras de muestra en el sistema que perjudicaran la integridad de las fibras de SPME. El resto de los factores (tipo de fibra, el tiempo de extracción, la temperatura de extracción y el porcentaje de NaCl en muestra) fueron estudiados. Para llevar a cabo la optimización metodológica, se empleó GC-QMS en modo SIM.

### 4.2.1. Tipo de fibra de SPME

La selección óptima del mejor tipo de fibra comercial para este estudio se realizó manteniendo constantes el resto de los parámetros de la etapa de extracción debido a que el tipo de fibra es una variable de tipo categórica. Se compararon cuatro tipos de fibras comerciales de SPME: PDMS, DVB-PDMS, CAR-PDMS, DVB/CAR-PDMS. Estas fibras fueron seleccionadas de acuerdo con estudios previos (14,48,49) y en base a las características de los analitos. En esta etapa de optimización, se realizaron extracciones con las siguientes condiciones: un estándar acuoso de 5 mL con una concentración de

todos los analitos de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y un contenido en NaCl del 10% (p/v), empleando  $50^\circ\text{C}$  y 30 min como condiciones de extracción, junto con el resto de los parámetros fijados e indicados con anterioridad para la etapa de desorción.

La Figura 4 muestra la eficacia de extracción obtenida para cada fibra, expresada como área de pico cromatográfico del ion cuantificador. Con CAR-PDMS, se obtuvieron las eficacias de extracción más bajas para todos los analitos. Por otro lado, los mejores resultados se obtuvieron con las fibras DVB-PDMS y DVB/CAR-PDMS. La fibra DVB-PDMS resulta la más adecuada para la extracción de los analitos más hidrofóbicos (Myr, HA, Limo, Eu, Ter, Lina y HB). Por su parte, con DVB/CAR-PDMS se obtienen las mayores eficacias de extracción en el caso de los analitos más polares, con áreas de pico que fueron 7, 3 y 4 veces más grandes con esta fibra respecto la DVB-PDMS en el caso de EB, BA y Pin, respectivamente. Además, se obtuvieron áreas de pico similares con estas dos fibras en el caso de Myr, Limo, Eu y Lina. Con el objetivo de favorecer la extracción de los analitos más polares y volátiles, que son los frecuentemente detectados en muestras de jugos de frutas tropicales, se seleccionó la fibra DVB/CAR-PDMS como la óptima. Cabe destacar que los analitos más sensibles para la fibra seleccionada son Ter y Limo.



**Figura 4.** Eficacia de extracción para cada fibra comercial

#### 4.2.2. Diseño experimental Doehlert

El resto de los parámetros de extracción fueron estudiados mediante un diseño experimental de tipo Doehlert. Los diseños de Doehlert se denominan “diseños de capa uniforme” debido a su distribución regular de los puntos experimentales en la superficie de las capas esféricas (55). Asimismo, el número de niveles en un diseño Doehlert no es el mismo para todas las variables, propiedad que permite asignar un número mayor de niveles a factores que tengan un efecto más fuerte y obtener una mayor información del sistema (56).

Cada diseño se define considerando el número de variables y los valores codificados ( $C_i$ ) de la matriz experimental. La relación entre valores codificados y reales viene dada por la Ecuación (1):

$$C_i = \left( \frac{X_i - X_i^0}{\Delta X_i} \right) \cdot \alpha \quad \text{Ecuación (1)}$$

donde  $C_i$  es el valor codificado para el nivel del factor  $i$ ,  $X_i$  es su valor real en un experimento,  $X_i^0$ , es el valor real en el centro del diseño experimental,  $\Delta X_i$  es el paso de variación del valor real y  $\alpha$  es el límite de valor codificado para cada factor.

El número de experimentos necesarios ( $N$ ) viene dado por  $N = k^2 + k + C_0$ , donde  $k$  es el número de variables y  $C_0$  es el número de puntos centrales. En este caso, se estudiaron tres variables: el tiempo de extracción, la temperatura de extracción y el porcentaje de NaCl en el vial de extracción, de forma que si se realiza tres veces el punto central  $C_0$  se concluyen 15 experimentos. Lo que se consigue con este estudio es disminuir el tiempo y el número de experimentos en el paso de optimización, a la vez que se puede observar posibles interacciones entre las variables. La Tabla 11 muestra los valores codificados y niveles operativos del diseño Doehlert que se llevó a cabo. Las experiencias se realizaron con los parámetros fijados anteriormente comentados, y con la fibra de SPME seleccionada, la DVB/CAR-PDMS.

En la Figura 5 se muestran los efectos de las variables estudiadas tras aplicar el diseño experimental descrito. Los resultados indican que la mayoría de los analitos no alcanzaron el equilibrio en el período estudiado (28–62 min) y empleando el resto de las condiciones descritas. Sin embargo, conviene resaltar que tiempos de extracción inferiores al tiempo de equilibración son aceptables siempre que las variables experimentales se controlen durante el desarrollo de los experimentos, para asegurar una adecuada reproducibilidad, y siempre que se consiga sensibilidad adecuada (33).

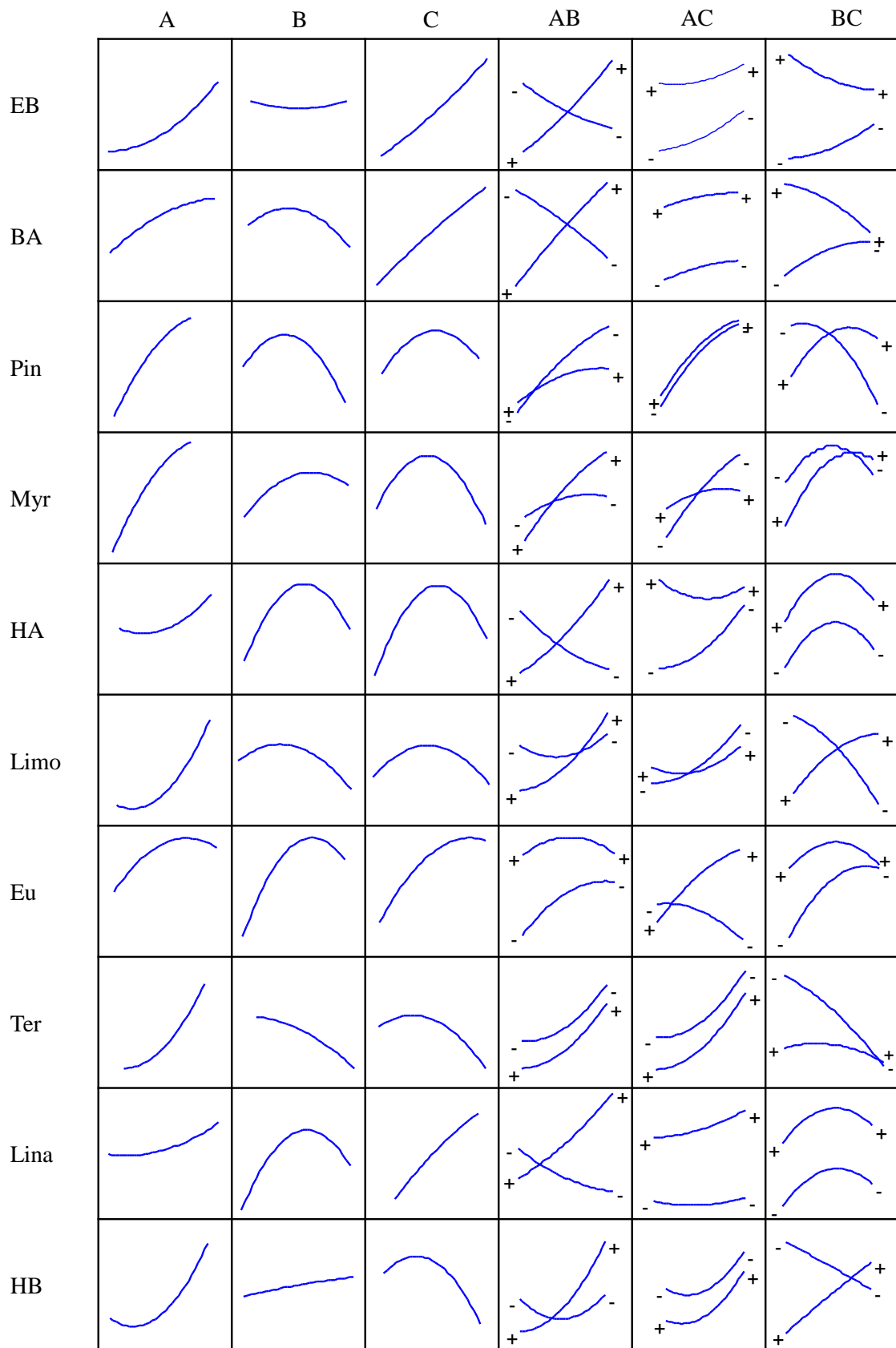
Asimismo, la Figura 5, en donde también se incluyen las interacciones entre las variables, indica que existe interacción entre tiempo y temperatura de extracción para la mayoría de analitos, salvo para el caso de Eu y Ter. La interacción entre las variables de temperatura de extracción y contenido de NaCl solo influye en el caso Myr, Limo y Eu. Por último, para el caso de la interacción entre tiempo de extracción y contenido en NaCl es relevante para Pin, Myr, Limo Ter y HB.

**Tabla 11.** Valores codificados y operativos del diseño Doehlert.

Experiencia	Tiempo de extracción (min)		Temperatura (°C)		Contenido en NaCl (% p/v)	
	C <sub>A</sub>	X <sub>A</sub>	C <sub>B</sub>	X <sub>B</sub>	C <sub>C</sub>	X <sub>C</sub>
1	0,00	45	0,00	50	0,00	12,5
2	1,00	62	0,00	50	0,00	12,5
3	0,50	54	0,87	67	0,00	12,5
4	0,50	54	0,29	56	0,82	25,0
5	-1,00	28	0,00	50	0,00	12,5
6	-0,50	36	-0,87	33	0,00	12,5
7	-0,50	36	-0,29	44	-0,82	0
8	0,50	54	-0,87	33	0,00	12,5
9	0,50	54	-0,29	44	-0,82	0
10	-0,50	36	0,87	67	0,00	12,5
11	0,00	45	0,58	62	-0,82	0
12	-0,50	36	0,29	55	0,82	25,0
13	0,00	45	-0,58	38	0,82	25,0
14	0,00	45	0,00	50	0,00	12,5
15	0,00	45	0,00	50	0,00	12,5

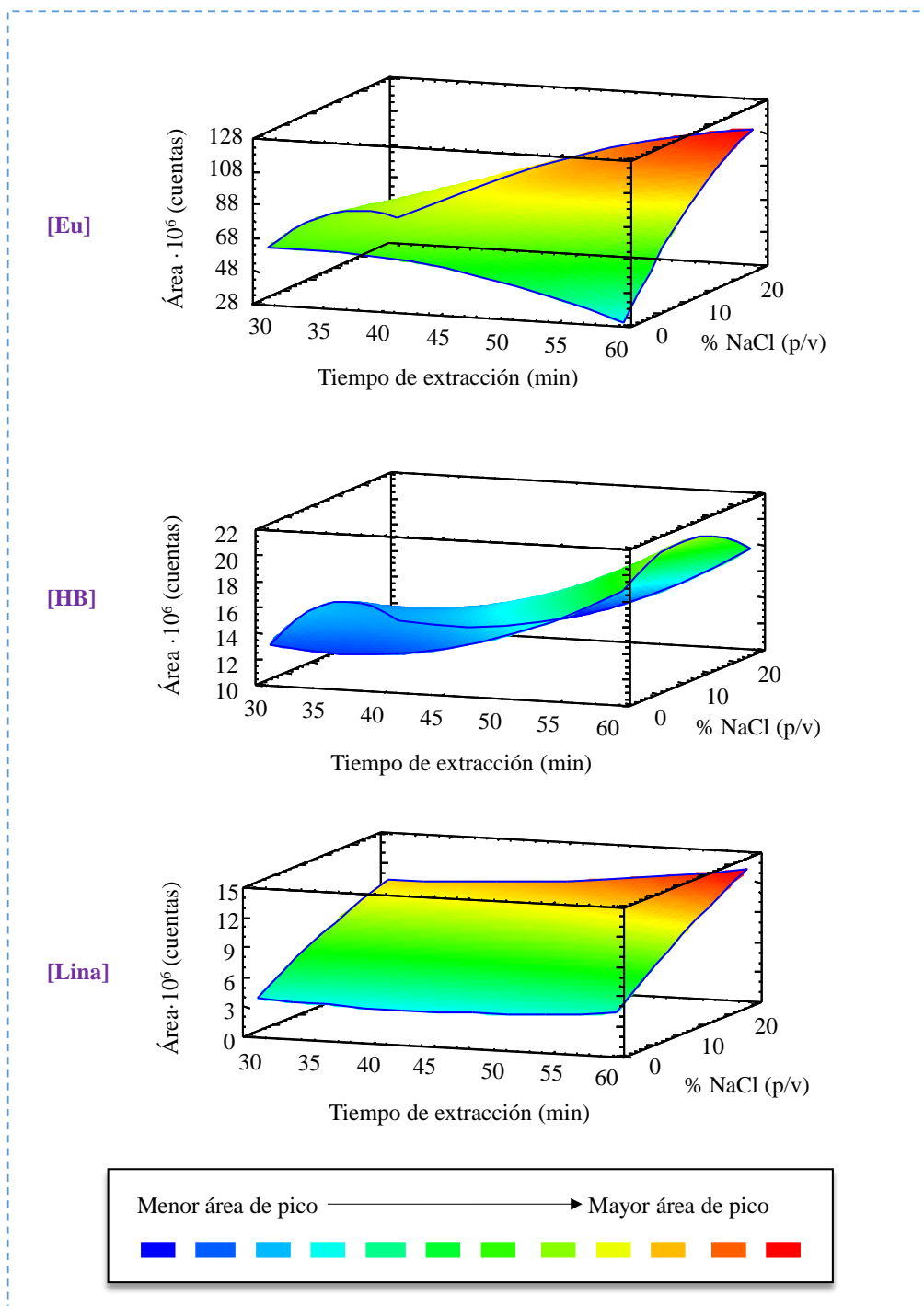
Nota: C<sub>i</sub> son los valores codificados para cada nivel del factor i, mientras que X<sub>i</sub> es su valor real en un experimento de acuerdo a la Ecuación (1).





**Figura 5.** Interacción entre las variables A (temperatura de extracción), B (tiempo de extracción) y C (contenido en NaCl).

Se obtuvieron asimismo las superficies de respuesta de las variables estudiadas para cada analito. La Figura 6 muestra las superficies de respuesta (tiempo de extracción  $\times$  contenido de NaCl para valores fijos de temperatura) para 3 analitos representativos del conjunto de compuestos estudiados.



**Figura 6.** Superficies de respuesta de Eu (similar al de Pin), HB (similar a las de Myr, HA, Limo, y Ter) y Lina (similar a las de EB y BA) para una temperatura de extracción de 50 °C.

Se utilizó la ecuación de respuesta polinomial de segundo orden indicada en la Ecuación (2) para correlacionar la respuesta (R), entendida como área de pico de cada analito, y las variables independientes.

$$R = \text{constante} + A[t_{\text{ext}}] + B[T_{\text{ext}}] + C[\text{NaCl}] + AA[t_{\text{ext}}]^2 + AB[t_{\text{ext}}][T_{\text{ext}}] + AC[t_{\text{ext}}][\text{NaCl}] + BB[T_{\text{ext}}]^2 + BC[T_{\text{ext}}][\text{NaCl}] + CC[\text{NaCl}]^2 \quad \text{Ecuación (2)}$$

donde A, B y C se corresponden con los coeficientes relacionados con las variables tiempo de extracción ( $[t_{\text{ext}}]$ ), temperatura de extracción ( $[T_{\text{ext}}]$ ) y porcentaje de NaCl ( $[\text{NaCl}]$ ), respectivamente. Las constantes y los coeficientes de Doehlert para cada analito se muestran en la Tabla 12.

Los valores óptimos obtenidos para el tiempo de extracción, temperatura de extracción y porcentaje de NaCl para mejorar la extracción de cada analito mediante HS-SPME se muestran en la Tabla 13. A la vista de estos resultados, se seleccionaron como condiciones óptimas de compromiso (intentando contentar al mayor número de analitos): 60 min, 60 °C y 20 % (p/v) de NaCl. Se puede observar que el tiempo de extracción de compromiso seleccionado proporciona eficacias de extracción adecuadas para todos los analitos, excepto para BA. Además, valores cercanos al 20% (p/v) de NaCl son adecuados para la mayoría de los analitos, excepto para Pin, Myr y Ter. Para ellos, las eficacias de extracción fueron mayores sin la adición de sal. Con respecto a la temperatura de extracción, puede observarse que influye de forma diferente para los analitos, siendo ~30 min par BA, Pin y Ter, ~60 min para Lin y ~67 min para el resto de los analitos. En cualquier caso, los resultados de compromiso no perjudican significativamente la eficacia extractiva del método, tal y como se observa en los valores de área de pico de compromiso en la Tabla 13, que sólo son un 3,8–32 % inferior respecto a las áreas de pico óptimas, dependiendo del analito.

**Tabla 12.** Constante y coeficientes de la Ecuación (2) del diseño experimental Doehlert obtenidos para cada analito.

<i>Analito</i>	<i>Constante</i> ( $\times 10^7$ )	<i>Coeficientes<sup>a</sup></i> ( $\times 10^3$ )								
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>AC</i>	<i>BB</i>	<i>BC</i>	<i>CC</i>
EB	1,01	-255	-211	170	0,962	4,14	-0,816	0,452	-1,68	0,621
BA	0,196	-66,2	-26,2	131	-0,190	1,90	-0,097	-0,426	-1,62	-0,248
Pin	-2,58	773	536	-178	-4,20	-4,01	-0,605	-5,02	8,68	-8,33
Myr	-1,17	487	-32,6	697	-5,19	7,09	-11,7	-2,79	1,99	-11,6
HA	2,90	-1340	113	1110	6,29	19,6	-8,93	-9,44	0,247	-20,7
Limo	3,36	-891	-167	-183	9,14	6,73	-6,86	-3,69	15,7	-12,3
Eu	-2,70	434	852	23,2	-4,56	-2,63	13,2	-5,75	-5,98	-7,40
Ter	0,723	-130	427	-203	9,06	-8,73	1,57	-2,35	6,76	-13,0
Lina	0,246	-644	529	295	2,71	8,24	3,39	-8,26	-0,631	-3,85
HB	5,18	-1210	-439	-405	10,8	7,80	1,91	-0,251	11,3	-14,8

<sup>a</sup> Siendo: **A**: tiempo de extracción (°C), **B**: temperatura de extracción (min) y **C**: % de NaCl (p/v). **AA**, **AB**, **AC**, **BB**, **BC** y **CC** indican interacciones entre las variables.

**Tabla 13.** Valores óptimos de tiempo de extracción, temperatura de extracción y contenido de NaCl en el método HS-SPME para la extracción de los analitos seleccionados.

<i>Analito</i>	<i>Tiempo de extracción óptimo (min)</i>	<i>Temperatura de extracción óptima (°C)</i>	<i>% NaCl óptimo (p/v)</i>	<i>Área de pico óptima<sup>a</sup> (×10<sup>6</sup>) (cuentas)</i>	<i>Área de pico de compromiso<sup>b</sup> (×10<sup>6</sup>) (cuentas)</i>
EB	62,3	67,3	24,2	3,75	3,01
BA	27,7	32,7	24,9	2,08	1,41
Pin	62,3	32,7	4,10	10,2	8,11
Myr	62,3	67,3	3,49	13,7	10,2
HA	62,3	67,3	13,7	20,4	18,6
Limo	62,3	67,3	14,9	17,8	17,1
Eu	62,3	46,8	25,0	11,4	9,61
Ter	62,2	32,7	4,36	28,1	20,0
Lina	62,3	55,3	25,0	14,7	13,4
HB	62,2	67,3	16,3	23,8	21,9
Condiciones de compromiso	60	60	20	-	-

<sup>a</sup>Áreas de pico calculadas a partir de la Ecuación (2) para las condiciones óptimas de cada analito.

<sup>b</sup>Áreas de pico calculadas a partir de la Ecuación (2) para las condiciones de compromiso.

### 4.3. Análisis cualitativo de los jugos de frutas haciendo uso de HS-SPME-GC-QQQMS

El análisis cualitativo de los analitos presentes en las muestras de jugos de piña MD, maracuyá y mango, fue llevado a cabo usando el método optimizado de HS-SPME en combinación con GC-QQQMS en modo SCAN. Una vez registrado el cromatograma de la muestra analizada, se extrajeron los espectros de masas en los máximos de los picos cromatográficos observados y se procedió a la identificación de los compuestos volátiles y semi-volátiles mediante su comparación con espectros de masas de la biblioteca NIST/EPA/NIH.

La Tabla 14 muestra los resultados obtenidos, incluyendo tiempos de retención, factor de coincidencia directo (Match) e inverso (R Match) y la probabilidad o porcentaje de similitud (P). Para la identificación, se tuvieron en cuenta las indicaciones de la NIST, que señala que un espectro de masas coincide con el de la biblioteca cuando su Match es mayor a 600 (57). Con esta recomendación, se identificaron 73 compuestos orgánicos volátiles diferentes. Sin embargo, en este estudio se tomó como criterio adicional para la identificación espectros la presencia de un valor de  $P > 20\%$  tras su comparación con la NIST. De esta forma, el listado se redujo a 55 compuestos identificados. Los compuestos identificados BA, hexanoato de metilo, Myr, hexanoato de etilo, HA, Limo, 3-careno, Ter, Lina y octanoato de etilo no se ajustaron a las reglas que se acaban de comentar. Sin embargo, en estos casos, se aceptaron valores ligeramente inferiores de Match o de P porque su identificación quedó confirmada por coincidencia de tiempos de retención y espectros en diferentes muestras, o bien por la inyección del correspondiente estándar en el GC-QQQMS, lo que supuso una doble confirmación.

Tal y como se observa en la Tabla 14, algunos de los compuestos fueron detectados en varias de las muestras analizadas, obteniendo en estos casos tiempos de retención y espectros de masas similares. Varios ejemplos de compuestos detectados en las tres muestras analizadas fueron el acetato de etilo, al que se le asocia el olor de la piña (19); EB, relacionado con el olor a manzana; el hexanoato de etilo, con el olor a la piel de la manzana y al melocotón; y el octanoato de etilo, que da olor a fruta y a grasas. En lo que respecta a los terpenos, se detectó Myr en todas las muestras y 3-careno en piña y mango. La Figura 7 muestra el cromatograma obtenido en el SCAN para la muestra de piña MD.

**Tabla 14.** Compuestos orgánicos volátiles identificados en el análisis cualitativo de jugos. Nota: en gris se indica analitos identificados en varias muestras.

<b>Analito</b>	<b>RT<sup>a</sup> (min)</b>	<b>Match<sup>b</sup></b>	<b>R Match<sup>c</sup></b>	<b>P<sup>d</sup> (%)</b>
<b>Piña MD</b>				
1 Acetato de etilo	1,40	854	854	90,0
2 Ác. [(aminocarbonil)amino]-oxo-acético	1,70	675	907	37,4
3 Butanoato de metilo	2,00	712	747	45,2
4 iso-Butanoato de etilo	2,40	706	713	37,5
5 2-Metilbutanoato de metilo	2,60	890	894	84,5
6 EB	2,90	841	861	86,8
7 2-Metilbutanoato de etilo	3,80	781	915	92,5
8 Pentanoato de etilo	5,20	773	862	92,5
9 Hexanoato de metilo <sup>e</sup>	6,00	890	893	86,7
10 Myr <sup>e</sup>	8,40	262	262	0,01
11 Hexanoato de etilo <sup>e</sup>	9,00	913	928	88,9
12 3-(Metiltio)propanoato de metilo	10,2	837	893	71,4
13 Limo <sup>e</sup>	10,4	430	430	0,2
14 3-Careno <sup>e</sup>	11,5	683	832	13,9
15 4-metoxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	12,1	780	839	70,9
16 Diacetato de 2,3-butanodiol	12,9	638	819	52,9
17 3-(metiltio)propanoato de etilo	14,3	797	887	92,1
18 4-Octenoato de metilo	15,2	810	868	64,2
19 Octanoato de metilo	15,8	874	904	87,5
20 Propanoato de acetilaminodietilo	17,6	598	672	27,3
21 4-Octeneato de etilo	19,8	800	804	32,0
22 Octanoato de etilo <sup>e</sup>	20,4	899	932	89,9
23 5-hexildihidro-2(3H)-furanona	24,0	583	815	21,1
24 Hexanoato de 3-hidroxietilo	25,4	689	712	57,3
25 Hexanoato de 5-(acetiloxi)etilo	28,4	695	846	59,0
26 Decanoato de etilo	32,9	861	901	80,1
27 Ftalato de etilpentadecilo	43,9	677	687	31,9
28 1,6-metil-4-(1-metiletil)naftaleno	45,5	792	672	52,1
29 5-(hexadeciloxi)-3-pentadecil-trans-1,3-dioxano	46,9	678	678	31,5

**Tabla 14.** (continuación).

Analito	RT <sup>a</sup> (min)	Match <sup>b</sup>	R Match <sup>c</sup>	P <sup>d</sup> (%)
<b>Maracuyá</b>				
1 Etanol	1,10	864	861	27,8
2 Acetato de etilo	1,50	880	893	91,7
3 Tolueno	2,60	833	872	94,7
4 EB	3,00	889	893	28,0
5 BA <sup>e</sup>	3,21	487	487	0,01
6 Myr <sup>e</sup>	8,60	581	849	91,5
7 Hexanoato de etilo <sup>e</sup>	9,10	931	936	48,1
8 HA <sup>e</sup>	9,70	653	806	13,3
9 Limo <sup>e</sup>	10,4	410	410	0,1
10 Ter <sup>e</sup>	12,4	628	628	0,1
11 Lina <sup>e</sup>	14,3	727	793	14,3
12 4-Terpinenol	18,7	669	864	51,9
13 Etil-3-(metiltio)-(E)-2-propenoato	19,2	650	836	27,8
14 Terpinenol	19,6	800	873	71,0
15 HB	20,0	802	869	85,7
16 Octanoato de etilo <sup>e</sup>	20,2	845	874	1,55
17 Ácido hexanoico	26,5	668	785	63,9
18 Hexanoato de 3-hexenilo	31,8	856	912	85,0
19 $\delta$ -Elemeno	32,7	682	721	38,9
20 6,10-Dimetilo-5,9-undecadien-2-ona	36,1	869	881	49,8
21 2-Propenoato de 3-feniletilo	36,7	765	910	49,5
22 Octanoato de hexilo	43,6	765	855	24,8



**Tabla 14.** (continuación).

Analito	RT <sup>a</sup> (min)	Match <sup>b</sup>	R Match <sup>c</sup>	P <sup>d</sup> (%)
<b>Mango</b>				
1 Acetato de etilo	1,50	707	707	38,7
2 EB	3,00	907	918	95,9
3 BA <sup>e</sup>	3,22	450	450	0,01
4 Acetato de iso-butilo	4,40	671	738	63,6
5 Hexanoato de metilo <sup>e</sup>	6,00	583	839	35,3
6 Myr <sup>e</sup>	8,75	567	567	0,69
7 Hexanoato de etilo <sup>e</sup>	9,10	916	927	85,5
8 HA <sup>e</sup>	9,70	582	810	16,2
9 Limo <sup>e</sup>	11,5	433	433	0,3
10 3-Careno <sup>e</sup>	11,5	812	877	23,4
11 Ter <sup>e</sup>	12,4	631	631	0,1
12 Benzoato de metilo	14,0	811	918	74,4
13 (E)-4,8-dimetilnona-1,3,7-trieno	15,3	751	865	53,5
14 Butanoato de 3-hexenilo	19,6	787	902	28,4
15 HB	20,0	827	889	72,4
16 Octanoato de etilo <sup>e</sup>	20,3	780	857	66,2
17 Acetato de octilo	21,2	829	861	38,1
18 Butanoato de 1-metilhexilo	21,4	829	850	62,2
19 Propanoato de 2-metilo	26,4	880	909	42,0
20 Hexanoato de 3-hexenilo	31,9	903	916	63,6
21 Hexanoato de metilo	32,4	899	910	83,7
22 2-Hexenoato de butilo	35,3	804	879	72,9
23 6,10-Dimetilo-5,9-undecadien-2-ona	36,1	857	871	34,9
24 Hexanoato de n-heptilo	38,1	794	848	59,0
25 Octanoato de hexilo	43,6	778	787	39,0
26 Octanoato de octilo	46,8	713	831	24,2

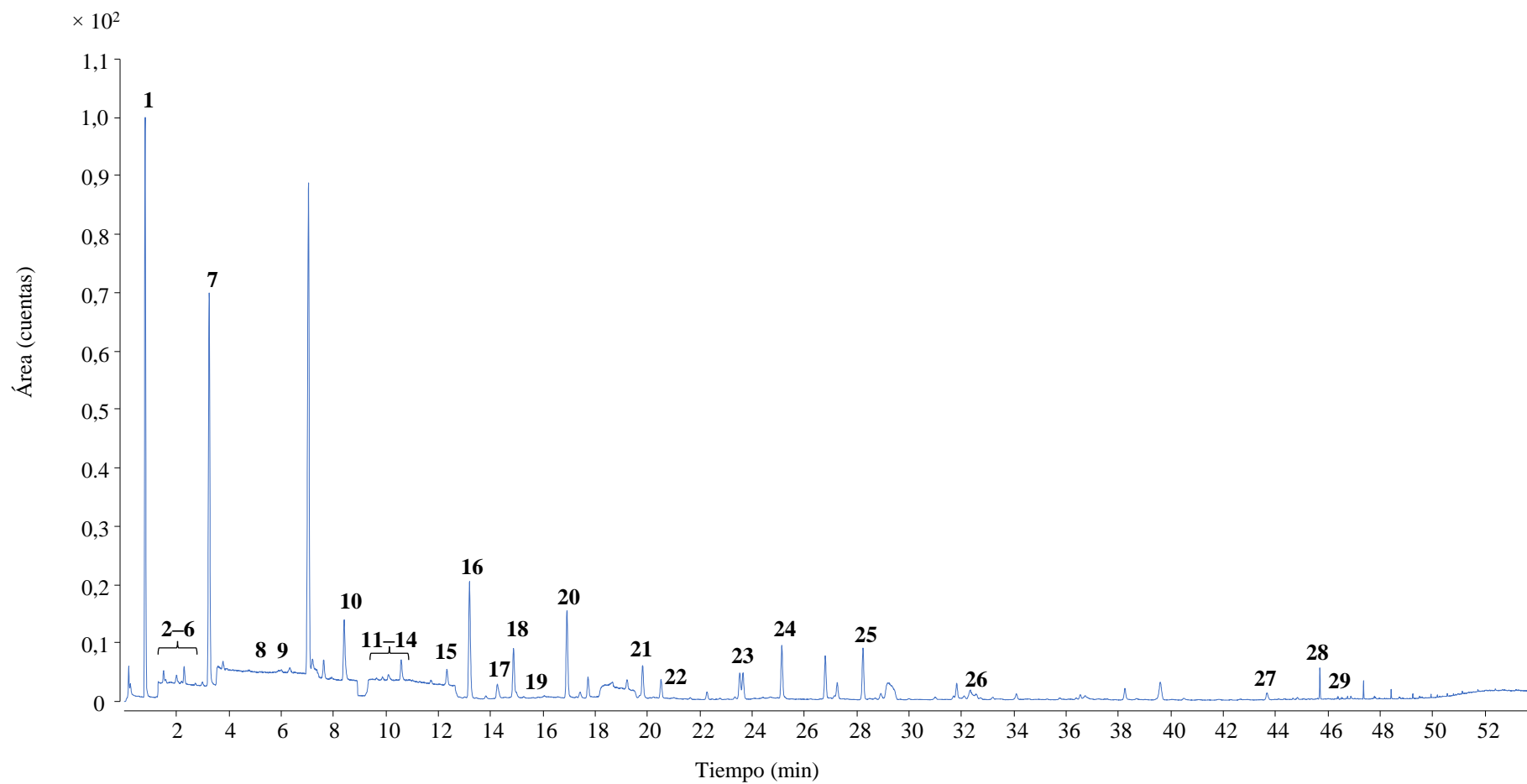
<sup>a</sup> Tiempo de retención en GC-MS.

<sup>b</sup> Match Factor o factor de coincidencia directo (0–1000), que compara la similitud del espectro de masas obtenido en GC-MS y el registrado en la NIST.

<sup>c</sup> Reverse Match Factor o factor de coincidencia inverso, que se emplea para discernir cuando dos analitos coeluyen en el cromatograma.

<sup>d</sup> Probabilidad, parámetro que se calcula en base a la lista de coincidencias de la NIST con respecto al espectro de masas obtenido en GC-MS y que también indica similitud.

<sup>e</sup> Para estos analitos, se aplican excepciones al criterio de Match >600 o P>20% por las razones indicadas en el texto.



**Figura 7.** Cromatograma representativo de la muestra de piña MD en las condiciones óptimas. La enumeración se corresponde con la indicada en la Tabla 14 para la piña MD. Los picos sin etiqueta no fueron identificados.

Asimismo, en la Tabla 14 se observa que la mayoría de analitos detectados fueron ésteres (un 62% de los casos, conteniendo entre 4 y 16 átomos de carbono) y terpenos (un 13,5%). Estudios previos también identificaron elevados porcentajes de ésteres y terpenos en la fracción volátil de frutas tropicales. Por ejemplo, Porto-Figueira, P. et al. identificaron 88 ésteres y 21 terpenos de un total de 169 VOCs en maracuyá (14). Además, se detectaron aldehídos y compuestos cetónicos, alcoholes y ácidos, entre otros. La mayoría de los compuestos fueron detectados en piña MD (29 compuestos frente a los 26 y 22 compuestos identificados en mango y maracuyá, respectivamente).

Conviene mencionar que los ésteres y terpenos seleccionados para el posterior análisis cuantitativo de jugos han sido detectados previamente por otros autores (ver Tabla 3). En este estudio cualitativo, también se identificaron la mayoría de analitos en maracuyá y mango, a excepción de Eu en ambos casos y Lina en mango. En piña MD, fueron identificados EB, Myr y Limo.

#### **4.4. Análisis cuantitativo de los jugos de frutas haciendo uso de HS-SPME-GC-QQQMS**

Una vez realizado el análisis cualitativo de las muestras y con el objetivo de poder cuantificar las muestras de jugo, se establece el método de HS-SPME-GC-QQQMS (modo SIM) para la determinación cuantitativa del conjunto de 10 analitos seleccionados, teniendo en cuenta las dificultades que tales determinaciones conllevan cuando se trata de volátiles y semi-volátiles en alimentos.

##### **4.4.1. Estudio del efecto de las matrices de jugos con respecto a los estándares acuosos**

Con objeto de poner a punto, optimizar y validar un método cuantitativo de análisis, y considerando la complejidad de las muestras a estudiar, primero se procedió a evaluar el efecto matriz. Este parámetro está íntimamente relacionado con las interferencias de la matriz que, de alguna forma, aumentan o disminuyen la señal instrumental que, en teoría, es producida sólo por el analito de interés, efecto particularmente significativo cuando se utiliza MS como sistema de detección. En el caso del análisis de frutas tropicales y sus jugos, existen factores como la viscosidad de la muestra, su fuerza iónica o la presencia de pulpa, entre otros, pueden alterar la transferencia de masa de analito desde la muestra al espacio en cabeza del vial, paso que se considera como limitante en los procedimientos de HS-SPME (33). Del mismo modo,

muchas de las especies volátiles y semi-volátiles de la muestra actúan como interferentes ya que co-eluyen con los analitos de interés y tienen iones comunes que asimismo pueden causar el denominado efecto matriz.

La puesta a punto y optimización del método cuantitativo de HS-SPME con GC-QQQMS se realizó empleando estándares acuosos de los analitos. Por lo tanto, en primer lugar, se estudió el efecto de la matriz de jugos de frutas tropicales respecto a las disoluciones acuosas ( $EM_{agua}$ ), conforme a la siguiente expresión:

$$EM_{agua}(\%) = \frac{A_{100} - A_b}{AA_{100}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

siendo  $A_{100}$  el área de pico cromatográfico de cada analito obtenido tras aplicar el método optimizado de HS-SPME-GC-QQQMS a 5 mL de las muestras de jugos de fruta (ver Tabla 5) previamente fortificada con los analitos a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $A_b$ , el área de pico obtenida tras aplicar el método a las muestras de jugos; y  $AA_{100}$ , el área de pico tras aplicar el método a un estándar acuoso conteniendo los analitos a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 15.** Efecto matriz observado cuando se analizan muestras de jugos de frutas tropicales con respecto a estándares acuosos.

<i>Analito</i>	<i>Efecto matriz (%)</i>			
	<i>Piña RE</i>	<i>Piña MD</i>	<i>Maracuyá</i>	<i>Mango</i>
EB	21,0	18,1	491	106
BA	19,4	14,0	18,5	14,0
Pin	30,8	25,2	6,04	25,0
Myr	32,0	29,1	7,93	15,3
HA	39,2	26,3	14,9	13,6
Limo	92,7	90,8	28,2	42,0
Eu	14,4	10,2	5,81	14,0
Ter	36,7	31,2	7,85	9,98
Lina	29,0	21,7	0,289	6,11
HB	26,2	17,8	5,73	2,68

Los valores de  $EM_{\text{agua}}$  oscilaron entre 14,4–92,4% para la muestra de piña RE, 10,2–90,8% para la piña MD, 0,289–491% para el maracuyá y 6,11–106% para el mango. Los valores más pequeños se alcanzaron para Eu en el caso de las muestras de piña y para Lina en el caso del maracuyá y el mango. Por lo tanto, se concluye que existe un efecto matriz significativo cuando se trabaja con muestras de jugos de frutas. Esto implica que no se puede emplear la calibración externa con estándares acuosos para cuantificar las muestras de jugos.

Durante la realización de los experimentos anteriores, se observó asimismo que la mayoría de analitos estudiados no fueron detectados en la muestra de piña RE, con la excepción de Myr, Lina y HB. Por ello, se estudió la posibilidad de emplear la piña RE para desarrollar un calibrado externo en la matriz con el que cuantificar el resto de analitos detectados en las restantes muestras de jugos. En este caso, se estudió el efecto matriz de las muestras de jugos respecto de la muestra de piña RE ( $EM_{\text{piñaRE}}$ ), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$EM_{\text{piñaRE}} (\%) = \frac{A_{100} - A_b}{(AP_{100} - AP_b)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

siendo  $A_{100}$ , área de pico cromatográfico de cada analito obtenido tras aplicar el método optimizado a las muestras de jugos fortificadas con los analitos a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $A_b$ , el área de pico obtenido tras aplicar el método a las muestras de jugos;  $AP_{100}$ , el área de pico tras aplicar el método a la piña RE fortificada con los analitos a una concentración de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $AP_b$ , el área de pico obtenida directamente con la muestra de piña RE.

La Tabla 16 incluye los resultados obtenidos, excluyendo los resultados de Myr, Lina y HB, ya que estos analitos habían sido detectados en la piña RE. Los resultados obtenidos indicaron la presencia de efecto matriz en las muestras de maracuyá y mango, con la excepción de BA en el caso del maracuyá, y de Ba, Pin y Eu cuando se analizó el mango. Sin embargo, se obtuvieron valores satisfactorios para todos los analitos en el caso de la piña MD, probablemente dada a la mayor similitud de estos dos tipos de muestras.

**Tabla 16.** Efecto matriz observado cuando se analizan muestras de frutas tropicales con respecto la muestra de piña RE.

<i>Analitos</i>	<i>Efecto matriz (%)</i>		
	<i>Piña MD</i>	<i>Maracuyá</i>	<i>Mango</i>
EB	86,2	2338	504
BA	72,3	95,6	72,1
Pin	81,7	19,6	81,1
HA	67,0	38,1	34,6
Limo	98,0	30,5	45,3
Eu	70,7	40,4	97,6
Ter	85,1	21,4	27,2

#### 4.4.2. Validación del método cuantitativo con piña RE

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior, se seleccionó la muestra de piña RE para la construcción de curvas de calibrado, recurriendo a dos tipos de calibración: (a) el método de adiciones estándar (AE), para determinar los analitos presentes en la muestra de piña RE (Myr, Lina y HB) y (b) un método de calibración externa en la matriz (CM), para el resto de analitos seleccionados.

En la Tabla 17 se muestran algunos de los parámetros de calidad analíticos obtenidos. Se obtuvieron amplios intervalos de linealidad, entre 10–150  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para la mayoría de los analitos (siendo el límite inferior 15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para EB y BA), y además se alcanzaron coeficientes de correlación (R) superiores a 0,9603. La sensibilidad analítica, expresada como pendiente de calibración, varió entre  $2,8 \pm 0,1$  para BA y  $121 \pm 4$  para HB.

Los límites de detección (LODs) y los límites de cuantificación (LOQs) se calcularon como 3 y 10 veces la relación señal-ruido, respectivamente. Para la estimación de la relación señal-ruido, se recurrió al software del GC-QQQMS. Se obtuvieron LODs comprendidos entre 0,45  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el Pin y de 5,49  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el EB. En el caso de los LOQs, los valores estuvieron comprendidos entre 1,51  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y 18,3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Es importante resaltar la alta sensibilidad del método desarrollado a pesar de la complejidad de las muestras analizadas, y los bajos valores de m/z para los iones de los analitos seleccionados.

**Tabla 17.** Parámetros de calidad relativos al calibrado en la matriz (CM) de piña RE. Nota: para el caso de Myr, Lina y HB, detectados en la muestra de piña RE, los resultados se refieren al método de adiciones estándar (AE).

<i>Analito</i>	<i>Intervalo trabajo (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	<i>(Pendiente <math>\pm</math> SD)<math>\cdot 10^{-4}</math></i>	<i>(<math>S_{y/x}^a</math>)<math>\cdot 10^{-5}</math></i>	<i>R<sup>b</sup></i>	<i>m<sup>c</sup></i>	<i>n<sup>d</sup></i>	<i>LOD<sup>e</sup></i>	<i>LOQ<sup>f</sup></i>	<i>Tipo de calibrado</i>
EB	15-150	22,7 $\pm$ 0,5	0,59	0,999	7	7	5,49	18,3	CM
BA	15-150	2,8 $\pm$ 0,1	1,6	0,994	7	7	4,38	14,6	CM
Pin	10-150	23 $\pm$ 3	38	0,960	7	8	0,45	1,51	CM
Myr	10-150	48 $\pm$ 4	9,6 $\cdot 10^{-6}$	0,983	7	8	1,23	4,10	AE
HA	10-150	31 $\pm$ 1	12	0,997	7	8	1,53	5,11	CM
Limo	10-150	50 $\pm$ 3	42	0,988	7	7	3,39	11,3	CM
Eu	10-150	25,1 $\pm$ 0,7	8,4	0,998	7	8	0,86	2,86	CM
Ter	10-150	63 $\pm$ 3	39	0,993	7	8	0,62	2,07	CM
Lina	10-150	31,5 $\pm$ 0,8	12	0,997	8	10	1,50	5,00	AE
HB	10-150	121 $\pm$ 4	51	0,997	7	8	1,41	4,70	AE

<sup>a</sup> Desviación estándar de los residuales del calibrado.

<sup>b</sup> Coeficiente de correlación.

<sup>c</sup> Niveles de concentración.

<sup>d</sup> Niveles del calibrado.

<sup>e</sup> Límite de detección, calculado como 3 veces la relación señal/ruido.

<sup>f</sup> Límite de cuantificación, calculado como 10 veces la relación señal/ruido.

Para comprobar la veracidad de los resultados anteriores de  $EM_{\text{piñaRE}}$  y validar el método, se realizó un estudio de reproducibilidad y recuperación relativa (RR) a un nivel de fortificación de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los resultados del estudio de reproducibilidad se muestran en la Tabla 18. Para su comparación, se recogen también los resultados obtenidos tras aplicar el método a estándares acuosos con el mismo nivel de concentración, en cuyo caso se obtienen valores de RSD comprendidos entre 1,24 y 16,5%.

Para el resto de los jugos de frutas tropicales, en general, se obtienen valores de RSD superiores debido a la mayor complejidad de estas muestras, con valores de entre 1,12–20,6% para piña RE, 2,78–16,0% para piña MD, 0,910–26,4% para maracuyá y 4,56–20,8% para mango. Los valores más altos se obtuvieron para el maracuyá en el caso de Lina. De cualquier forma, conviene resaltar que, en el caso de muestras complejas, valores de RSD inferiores al 30% se consideran aceptables, en particular con la metodología de HS-SPME (58,59).

**Tabla 18.** Reproducibilidad, expresada como desviación estándar relativa (RSD), obtenida en el análisis de frutas tropicales fortificadas (o estándares acuosos) mediante el método optimizado HS-SPME-GC-QQQMS.

<i>Analito</i>	<i>RSD<sup>a</sup> (%)</i>				
	<i>Estándar aq.</i>	<i>Piña RE</i>	<i>Piña MD</i>	<i>Maracuyá</i>	<i>Mango</i>
EB	8,50	20,6	9,42	3,66	10,3
BA	9,16	16,5	19,3	17,7	5,81
Pin	16,5	2,61	19,4	2,08	4,60
Myr	8,73	19,6	9,84	7,51	4,56
HA	4,08	20,5	4,40	15,8	13,0
Limo	6,83	1,12	13,2	0,910	11,9
Eu	10,7	17,4	2,78	23,8	10,6
Ter	6,51	15,6	16,0	16,8	20,8
Lina	1,24	12,3	9,56	26,4	8,27
HB	3,85	11,8	6,23	19,8	7,59

<sup>a</sup> n = 3 (nivel de concentración de los analitos:  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )



Para calcular las recuperaciones relativas (RR), se utilizó la siguiente expresión:

$$RR(\%) = \frac{C_{100} - C_b}{100 \mu g \cdot L^{-1}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación (5)}$$

siendo  $C_{100}$  la concentración obtenida tras aplicar el método optimizado a las muestras de jugo fortificadas con los analitos a un nivel de concentración de  $100 \mu g \cdot L^{-1}$  y  $C_b$  la concentración obtenida al analizar cada muestra. Para el cálculo de estas concentraciones, se empleó los CM en piña RE.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 19. Se obtuvieron RRs aceptables en el caso de las muestras de piña, con valores que oscilaron entre 108–121% y entre 78,0–116% para piña RE y piña MD, respectivamente. Además, se obtuvieron valores aceptables de RR para BA en el caso del maracuyá y para BA, Pin y Eu en el caso de la muestra de mango. Conviene mencionar que estos valores están en concordancia con los resultados obtenidos en la Tabla 16. De esta forma, se puede dar por aceptable el método de CM desarrollado en el caso de los analitos/muestras señalados.

**Tabla 19.** Recuperaciones relativas obtenidas cuando se analizan diversas frutas tropicales usando el calibrado en la matriz de piña RE.

<i>Analito</i>	<i>Recuperación relativa (%)</i>			
	<i>Piña RE</i>	<i>Piña MD</i>	<i>Maracuyá</i>	<i>Mango</i>
EB	117	101	2727	588
BA	108	78,0	103	77,8
Pin	121	98,5	23,6	97,8
HA	119	80,0	45,4	41,3
Limo	118	116	35,9	53,5
Eu	113	79,5	45,5	110
Ter	121	113	28,5	36,2

Nota: los analitos Myr, Lina y HB fueron excluidos porque fueron detectados en la muestra de Piña RE.

#### **4.4.3. Análisis cuantitativo de los jugos de frutas**

Una vez optimizada y validada la metodología, se llevó a cabo el análisis de las muestras en los casos en que se obtuvieron RR favorables (indicados en la sección anterior). La Tabla 20 incluye los resultados obtenidos. Los analitos detectados en la muestra de piña RE fueron analizados mediante AE. Sin embargo, en los tres casos se obtuvieron valores inferiores al LOQ. Además, se observaron intervalos de confianza relativamente elevados en los casos de Lina y HB, probablemente por estar por debajo de estos valores de LOQ. El EB fue detectado en la muestra de piña MD a concentraciones superiores al límite de linealidad (LOL), por lo que en estudios posteriores se procederá a diluir la muestra para proceder a su cuantificación. Finalmente, BA y Pin fueron correctamente cuantificados en las muestras de maracuyá y/o mango, con valores que oscilaron entre los 24 y 94  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Tal y como se muestra en la Tabla 20, estos analitos han sido previamente detectados en muestras de frutas tropicales. Por otra parte, otros compuestos volátiles, incluyendo Limo, se cuantificaron en muestras de mango, con concentraciones también en el nivel de los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  aunque con valores ligeramente superiores (52).

**Tabla 20.** Análisis de muestras con el método de HS-SPME-GC-QQQMS.

<i>Analitos</i>	<i>Concentración en las muestras analizadas <math>\pm SD^a</math> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>				<i>Estudios previos que identifican los analitos</i>		
	<i>Piña RE</i>	<i>Piña MD</i>	<i>Maracuyá</i>	<i>Mango</i>	<i>Piña</i>	<i>Maracuyá</i>	<i>Mango</i>
EB	nd <sup>b</sup>	1899 $\pm$ 25 > LOL	nc <sup>d</sup>	nc	(48,49)	(14,50,51)	-
BA	nd	nd	43 $\pm$ 10	94 $\pm$ 13	(48,49)	(14,51)	-
Pin	nd	nd	nc	24 $\pm$ 1	(48)	(51)	(47,53)
Myr	3,05 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup> $\approx$ LOQ	nc	nc	nc	(48)	-	(47,53,54)
HA	nd	nd	nc	nc	(49)	(14,51)	-
Eu	nd	nd	nd	nd	-	-	(54)
Limo	nd	10 $\pm$ 1 < LOQ	nc	nc	(48,49)	(50,51)	(47,53,54)
Ter	nd	nd	nc	nc	-	(50,51)	(47,53,54)
Lina	1,33 $\pm$ 72544 <sup>c</sup> < LOQ	nd	nc	nd	-	(51)	(54)
HB	0,190 $\pm$ 4 <sup>c</sup> < LOQ	nd	nc	nc	-	(14,50,51)	(53)

<sup>a</sup> Desviación estándar.

<sup>b</sup> Analito no detectado en la muestra.

<sup>c</sup> Concentración calculada por adiciones estándar para la muestra de piña RE.

<sup>d</sup> Detectado pero no cuantificable por las razones indicadas en el texto.

## 5. Conclusiones

En este Trabajo de Fin de Máster, se ha propuesto una metodología analítica de HS-SPME-GC-QQQMS para el análisis cualitativo y cuantitativo de VOCs en muestras de jugos de tres frutas tropicales de distinta naturaleza (piña, maracuyá y mango). Las conclusiones que se derivan de este trabajo de investigación son las siguientes:

- Se ha conseguido la separación analítica de 10 analitos volátiles en GC-QMS y GC-QQQMS en un tiempo de 59 y 54 min, respectivamente. En ambos casos, se consiguieron separaciones con resolución mayor a 1,5 y la correcta identificación de los analitos empleando tanto el modo SCAN como SIM.
- En lo que respecta al método de HS-SPME, la fibra comercial DVB/CAR-PDMS resultó la más adecuada para extraer los analitos estudiados y, especialmente, los más polares y volátiles. Para esta fibra, usando 60 °C, 60 min y 20 % (p/v) de NaCl como condiciones extracción, se consiguen eficacias de extracción óptimas de acuerdo con el diseño experimental realizado.
- En el análisis cualitativo de los jugos de frutas tropicales seleccionados, se identificaron 55 VOCs diferentes, de los cuales un 62% se corresponde con ésteres y un 13,5% con terpenos, además de aldehídos y compuestos cetónicos, alcoholes y ácidos. Entre ellos, se encontraron los analitos seleccionados para el posterior estudio cuantitativo. La mayoría de los compuestos fueron detectados en piña MD (29 compuestos frente a los 26 y 22 compuestos en mango y maracuyá, respectivamente). Algunos compuestos fueron detectados en varias de las muestras analizadas, asegurando tal identificación tanto con el tiempo de detección como con la observación de espectros de masas similares.
- Los estudios realizados de efecto matriz respecto de estándares acuosos indicaron que no se puede emplear la calibración externa en medio acuoso para la determinación de los analitos seleccionados en estas muestras de jugos de frutas tropicales. Sin embargo, no se observa efecto matriz con respecto a la piña RE si se determina BA en el caso del maracuyá, Ba, Pin y Eu en mango, y 7 de los 10 analitos estudiados en el caso de la piña MD (con las excepciones de Myr, Lina y HB, que fueron los únicos analitos detectados en piña RE).
- Se validó de forma satisfactoria el método cuantitativo de HS-SPME-GC-QQQMS (en modo SIM) para la determinación de los analitos seleccionados empleando la muestra de piña RE como matriz y recurriendo a dos tipos de calibración: (a) el método de adiciones estándar (AE) para los casos de Myr, Lina

y HB y (b) el método de calibración externa en la matriz (CM) para el resto de analitos. Con esta metodología se obtuvieron amplios intervalos de linealidad y R superiores a 0,960 (los cuales son altamente adecuados cuando se determinan volátiles por HS-SPME). Además, se alcanzaron bajos LODs, comprendidos entre 0,62 y 5,49  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

- Se obtuvieron valores de RSD comprendidos entre 1,12 y 20,6% para la piña RE, 2,78–16,0% para piña MD, 0,91–26,4% para maracuyá y 4,56–20,8% para mango, y RRs que oscilaron entre 108-121 % y entre 78,0–116% para piña RE y piña MD, respectivamente, lo que señala que la metodología es satisfactoria. Además, se obtuvieron valores aceptables de RR para BA en el caso del maracuyá, Ba, Pin y Eu en mango, valores que reafirmaron la validez del método propuesto en los casos mencionados.
- En lo que respecta al análisis cuantitativo, BA y Pin fueron correctamente cuantificados en las muestras de maracuyá y/o mango, con concentraciones que oscilaron entre 24 y 94  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En base a estas conclusiones, se han planteado expectativas de trabajo futuro en lo que respecta al análisis de jugos de frutas tropicales mediante HS-SPME-GC-MS:

- Proceder a la dilución de la muestra de piña MD para la determinación de EB.
- Proponer métodos de calibración alternativos para suprimir el efecto matriz de los jugos de frutas tropicales, tales como:
  - Calibración con estándar interno en piña RE.
  - Calibración empleando jugos de fruta diluidos en medios acuosos o jugos de fruta sin pulpa.
  - Calibración empleando matrices de otros alimentos.
  - Recurrir al método de calibración por adiciones estándar.
- Proponer alternativas para mejorar la sensibilidad del método, tales como:
  - Desarrollo y empleo de fibras de SPME más sensibles para analitos volátiles (por ejemplo, basadas en novedosos materiales como polímeros de líquidos iónicos o redes metal-orgánicas).
  - Empleo de modalidades de extracción diferente (por ejemplo, el método de HS-SPME en condiciones de presión reducida).
- Proceder al análisis de un mayor número de muestras y su análisis mediante estudios quimiométricos, pudiendo discriminar entre variedades de frutas o

ayudando al agricultor en lo que respecta a técnicas de cultivo en base al perfil volátil de las frutas.

## 6. Abreviaturas

CAR-PDMS	Carboxen-Polidimetilsiloxano
CE	Electroforesis capilar
DI-SBSE	Extracción asistida con barra agitadora sorbente en modalidad de inmersión directa
DI-SPME	Microextracción en fase sólida en modalidad de inmersión directa
DVB/CAR-PDMS	Divinilbenzeno/Carboxen-Polidimetilsiloxano
DVB-PDMS	Divinilbenzeno-Polidimetilsiloxano
EI	Impacto electrónico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FID	Detección de ionización en llama
GC	Cromatografía de gases
HILIC	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica
HS	Espacio en cabeza
HS-SBSE	Extracción asistida con barra agitadora sorbente en modalidad de espacio en cabeza
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en modalidad de espacio en cabeza
LC	Cromatografía líquida
LOD	Límite de detección
LOL	Límite de linealidad
LOQ	Límite de cuantificación
MS	Espectrometría de masas
O	Detección por olfactometría
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
Q	Analizador másico cuadrupolar simple
QQQ	Analizador másico cuadrupolar triple
SBSE	Extracción asistida con barritas agitadoras sorbentes
SCAN	Barrido de un intervalo de masas en el analizador másico

SIM	Monitorización selectiva de iones en el analizador másico
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TFM	Trabajo Fin de Máster
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles



## 7. Referencias

- (1) Po, L.G. *Handbook of Food Products Manufacturing* **2007**, 36, 816–845.
- (2) Galán, V. *Mundo rural de Tenerife* **2016**, 15, 6–9.
- (3) Bapat, V. A.; Nath, P. *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28, 94–107.
- (4) Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). *Major Tropical Fruits Market Review 2019* **2020**, Rome. <http://www.fao.org/publications/card/es/c/CA7566EN/> (Último acceso 06/09/21).
- (5) Gobierno de Canarias, Conserjería de Agricultura, Ganadería y Pesca. <https://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/> (Último acceso 06/09/21).
- (6) Marca Canaria, Variedad de frutas tropicales en canarias. <https://marcacanaria.com/variedades-de-frutas-tropicales-canarias/> (Último acceso 06/09/21).
- (7) Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA) <https://www.icia.es/icia/> (Último acceso 06/09/2021).
- (8) Ali, M. M.; Hashim, N.; Aziz, S. A.; Lasekan, O. *Food Res. Int.* **2020**, 137, 109675.
- (9) Bhat, R.; Paliyath, G. *Encycl. Food Health* **2016**, 3, 138–144.
- (10) Cannon R. J.; Ho C. J. *Food Drug Anal.* **2018**, 26, 445–468.
- (11) Villacís-Chiriboga, J.; Elst, K.; Camp, J. V.; Vera, E.; Rules, J. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, 19, 405–447.
- (12) Kende, A.; Lim, P. P.; Lai, F.; Jessop, M.; Swindale, L.; Oliver, M.; Hurr, B.; Rickett, D.; Baxter, C. *Food Chem.* **2019**, 270, 368–374.
- (13) Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bicchi, C. *Flavour Fragrance J.* **2010**, 25, 282–290.
- (14) Porto-Figueira, P.; Freita, A.; Cruz, C.; Figueira, J.; Câmara, J. *Food Res. Int.* **2015**, 77, 408–418.
- (15) Lasekan, O.; Abbas, K. A. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2012**, 52, 726–735.
- (16) Torres, J. D.; Talens, P.; Carot, J. M.; Chiralt, A.; Escriche, I. *Food Chem.* **2007**, 101, 219–228.
- (17) Li, C.; Xin, M.; Li, L.; He, X.; Yi, P.; Tang, Y.; Li, J.; Zheng, F.; Liu, G.; Sheng, J.; Li, Z.; Sun, J. *Food Chem.* **2021**, 355, 129685.
- (18) Janzanti, N. S.; Macoris, M. S.; Garruti, D. S.; Monteiro, M. *Food Sci. Technol.* **2012**, 46, 511–518.
- (19) Flavornet. <http://www.flavornet.org/flavornet.html> (Último acceso el 06/09/21).

- (20) Taite, C.; Costa, C.; Menesatti, P.; Caparrotta, S.; Bazihizina, N.; Azzarello, E.; Petrucci, W. A.; Massi, E.; Giordani, E. *Eur. Food Res. Technol.* **2015**, 241, 911–902.
- (21) Lubes, G.; Goodarzi, M. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 6399–6422.
- (22) Lima, T. C.; Santos, R. S.; Silva, S. Y. S.; Santos, D. A.; Silva, S. C.; Gomes, A. A.; Oliveira, M. C. F.; Alves, K. F.; Pinto, L.; Oliveira, M. N. *Food Chem.* **2021**, 362, 130150.
- (23) Rahseed, D.; Serag, A.; Shakour, Z. T. A.; Farag, M. *Talanta* **2020**, 223, 121710.
- (24) Jelen, H. H.; Majcher, M. A.; Dziadas, M. T. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 738, 13–26.
- (25) Pino, J. A.; Castro-Benítez, M.; Winterhalter, P. *Int. J. Fruit Sci.* **2019**, 20, 403–413.
- (26) Cuevas- Glory, L. F.; Sauri-Duch, E.; Sosa-Miguel, O.; Pino, J. A. *Chem. Pap.* **2020**, 74, 4025–4032.
- (27) Valverde, M. A. F.; Sánchez-Palomo, E.; Alises, M. O.; Romero, C. C.; González-Viñas, M. A. *Foods*, **2021**, 10, 1683.
- (28) Ma, W.; Zhu, Y.; Shi, J.; Wang, J.; Wang, M.; Shao, C.; Yan, H.; Lin, Z.; Lv, H. *Food Chem.* **2021**, 346, 128906.
- (29) He, J.; Wu, X.; Yu, Z. *Food Chem.* **2021**, 364, 130388.
- (30) Huie, C. W. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 23–30.
- (31) Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C. J. *J. Microcolumn Sep.* **1999**, 11, 737–747.
- (32) Camino-Sánchez, F.J.; Gómez, A. Z.; Santos-Fandila, A.; Vílchez, J. L. *Talanta* **2014**, 130, 1, 388–399.
- (33) Pawliszyn, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. 1; Elsevier: Londres, Reino Unido, **2012**.
- (34) Zhang, Z.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1843–1852.
- (35) Reyes-Garcés, N.; Gionfriddo, E.; Gómez-Ríos, G. A.; Alam, M. N.; Boyacı, E.; Bojko, B.; Singh, V.; Grandy, J.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 302–360.
- (36) Merck KGaA, **2021**, Solid Phase Microextraction (SPME), <https://www.sigmaaldrich.com/ES/en/applications/analyticalchemistry/samplepreparation/solid-phase-microextraction> (Último acceso 06/09/2021).
- (37) Gerstel, Microextracción en fase sólida SPME <http://www.gerstel.es/es/SPMEes.htm> (Último acceso 06/09/2021).

- 
- (38) Souza-Silva, E. A.; Gionfriddo, E.; Pawliszyn, J. *Trends Anal. Chem.* **2015**, 71, 236–248.
- (39) Caprioli, G.; Cortese, M.; Cristalli, G.; Maggi, F.; Odello, L.; Ricciutelli, M.; Sagratini, G.; Sirocchi, V.; Tomassoni, G.; Vittori, S. *Food Chem.* **2012**, 135, 1127–1133.
- (40) Pacheco-Fernández, I.; Trujillo-Rodríguez, M. J.; Kuroda, K.; Holen, A. L.; Jensen, M. B.; Anderson, J. L. *Talanta* **2019**, 200, 415–423.
- (41) Trujillo-Rodríguez, M. J.; Yu, H.; Cole, W. T. S.; Ho, T. D.; Pino, V.; Anderson, J. L.; Afonso, A. M. *Talanta* **2014**, 121, 153–162.
- (42) Descours, E. Hamleton, A.; Kurek, M.; Debeaufort, F.; Voilley, A.; Seuvre, A. - M. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 95, 560–568.
- (43) Teribia, N.; Buvé, C.; Bonerz, D.; Aschoff, J.; Hendrickx, M.; Loey, A. M. *LWT* **2021**, 150, 112007.
- (44) Goh, R. M. V.; Pua, A.; Ee, K. M.; Huang, Y.; Liu, S.Q.; Lassabliere, B.; Yu, B. *Food Res. Int.* **2021**, 148, 110607.
- (45) Farcu, M.; Copes, B.; Le-Navenec, G.; Marroquin, J.; Cantu, D.; Bradford, K. J.; Guinard, J. -X.; Van Deynze, A. *Food Chem. X* **2020**, 8, 100107.
- (46) Turazzi, F. C.; Morés, L.; Merib, J.; Carasek, E.; Narain, N.; Lima, L. K.; Nunes, M. L. *Food Sci. Technol.* **2017**, 34, 6636–72.
- (47) Zhang, W.; Dong, P.; Lao, F.; Liu, F.; Liao, X.; Wu, J. *Food Chem.* **2019**, 289, 215–222.
- (48) Xiao, Z.; Chen, L.; Niu, Y.; Zhu, J.; Zhang, J.; Deng, J. *Food Anal. Methods* **2021**, 14, 1714–1729.
- (49) Steingass, C. B.; Grauwet, T.; Carle, R. *Food Chem.* **2014**, 150, 382–391.
- (50) Mamede, A.; Soares, A. G.; Oliveira, E.; Farah, A. *J. Chem.* **2017**, 2, 1–9.
- (51) Costa, G.; Prado, A.; Sebastião da Silva, J.; Matias de Alencar, S. *Ciência Rural* **2015**, 45, 2, 356–363.
- (52) San, A. T.; Joyce D. C.; Hofman, P. J.; Macnish, A. J.; Webb R. I.; Matovic, N. J.; Williams, C. M.; De Voss, J. J.; Wong, S. H.; Smyth, H. E. *Food Chem.* **2017**, 221, 613–619.
- (53) Lan, T.; Bao, S.; Wang, J.; Ge, Q.; Zhang, H.; Yang, W.; Sun, X.; Ma, T. *Food Biosci.* **2021**, 42, 101060.
- (54) Brito, T. B. N.; Lima, R. S.; Santos, M. C. B.; Moreira, R. F. A.; Cameron, L. C.; Fai, A. E. C.; Ferreira, M. S. L. *Food Chem.* **2021**, 339, 127882.

- 
- (55) Araujo, P; Janagap, S. *J. Chromatogr. B* **2012**, 910, 14–21.
- (56) Ferreira, S. L. C.; dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosquesendra, J. M. *Talanta* **2004**, 63, 1061–1067.
- (57) NIST, NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Compound Scoring: Match Factor, Reverse Match Factor, and Probability. <https://www.nist.gov/> (Último acceso 06/09/21).
- (58) Naz, S.; Vallejo, M.; García, A.; Barbas, C. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1353, 99–105.
- (59) Živković, T.; Karačonji, I. B.; Safner, T.; Brajenović, N.; Lovaković, B. T.; Pizent, A. *Talanta*, **2018**, 176, 537–543.