



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



“CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE QUESOS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRAFÍA DE GASES”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A:  
JORGE LUIS SANTOS HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2001



EXÁMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

<b>Presidente</b>	GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI
<b>Vocal</b>	AMELIA MA. DE GPE. FARRES GONZALEZ SARAVIA
<b>Secretario</b>	ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ
<b>1er suplente</b>	EVANGELINA CAMACHO FRIAS
<b>2o. Suplente</b>	LAURA PATRICIA PEREZ CACEP

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 101 de Cromatografía. Departamento de Química Analítica.  
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR:

  
Dra. Araceli Patricia Peña Alvarez

SUPERVISOR TÉCNICO:

  
M en C. Carmen Labastida Rubio

SUSTENTANTE:

  
Jorge Luis Santos Hernández

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** y a la **Facultad de Química**: por haberme brindado la oportunidad de tener una carrera profesional.

A la **Dra. Araceli Peña Alvarez**: por su excelente dirección en la realización de este trabajo y por su apoyo en todo momento.

A la **M.C. Elisa Cuellar**: por el gran apoyo y confianza que me brindó durante mi formación profesional.

A la **M.C. Carmen Labastida Rubio**: por su valioso apoyo en la realización de este trabajo.

Al **H. Jurado de esta Tesis**: por su paciencia en la revisión y corrección de dicho trabajo.

A **todos los profesores de la Facultad**: por sus valiosas enseñanzas dentro de las aulas de clase.

**A todas las personas que me brindaron su amistad.**

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios:**

Por haberme dado la vida, y permitirme llegar a esta etapa, con una formación profesional.

Gracias por darme la oportunidad de hacer lo que me gusta: “Química en los alimentos”.

### **A Lucila Hernández Medina:**

Por el inmenso amor que me dio día con día. Por su ejemplo de fortaleza y la enorme confianza que deposito en mí a pesar de mis errores. Por su gran apoyo y sus palabras de aliento al iniciar cada día. **Gracias Mamá.**

### **A Pascual Santos García:**

Por su inmenso amor y por su apoyo durante toda mi vida. Por sus consejos tan valiosos para mi formación. Por la confianza depositada en mí. **Gracias Papá.**

**A mis Hermanos:**

**Ana Laura y Humberto Ignacio**

Por su ayuda en cada momento de mi vida, por los consejos que nunca faltaron de parte de ellos.

Por su valioso ejemplo de optimismo y sobre todo por cada momento que juntos vivimos.

**Gracias Laura y Beto.**

**A mi primo y mis tíos:**

A mi primo Jorge Ignacio por la alegría que solo él puede tener. A mis tíos Sara y Nacho por su cariño y su apoyo incondicional durante toda mi carrera. **Gracias.**

**A mis amigos:**

Alejandro, Marcos, Orlando, Nacho, Michelle, Sandriux, Alejandra, Nancy, Isabel, Luis, Benjamín, Elisa, Cosa, Lupita, Sara, Ernesto, Mayerlin, Víctor, Sergio I., Lizbeth, Argelia, Claudia, Jessica, Sergio H., Karla, Magda, Roberto, Israel, Carla, Gustavo, Alejandro B., Rogelio, Andrés, Jacqueline, Mara, Abraham. Porque con su apoyo me dieron la oportunidad de conocer a los verdaderos amigos, y que por siempre perdure nuestra amistad. **Gracias Amigos.**

## INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	2
1.1 El queso	2
1.2 El aroma y los componentes volátiles en quesos	4
1.3 Los ácidos grasos	7
1.4 Microextracción en Fase Sólida	9
1.5 Cromatografía de gases (CG)	13
2. PARTE EXPERIMENTAL	15
2.1 Materiales y reactivos	15
2.2 Evaluación sensorial	15
2.3 Determinación de las Condiciones cromatográficas	16
2.4 Preparación de la muestra	17
2.5 Determinación de la temperatura del análisis de la muestra	17
2.6 Determinación del tiempo de extracción	18
2.7 Determinación del tiempo de desorción	18
2.8 Identificación de compuestos volátiles	19
2.8.1 Identificación de compuestos	19
2.8.2 Cromatografía de gases Espectrometría de masas (CG-EM)	19
2.9 Determinación de compuestos volátiles de quesos	19
2.10 Determinación de la precisión del método	20
2.11 Efecto de la polaridad de la fibra	20

2.12	Análisis con enfriamiento de la Fibra	20
2.13	Análisis con diferentes condiciones en el baño de agua durante la extracción	21
2.14	Determinación de acetaldehído	21
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	22
3.1	Análisis sensorial de quesos	22
3.2	Desarrollo y optimización de un método por MEFS	23
3.2.1.	Condiciones cromatográficas	23
3.2.2.	Determinación de la temperatura del análisis de la muestra	26
3.2.3.	Tiempo de extracción	28
3.2.4.	Tiempo de desorción	30
3.3	Identificación de los compuestos volátiles por CG-EM	33
3.4	Precisión del método	35
3.5	Análisis de la composición de ácidos grasos en diferentes quesos	42
3.6	Efecto de la polaridad de la fibra	53
3.7	Análisis con enfriamiento de la fibra	56
3.8	Análisis con diferentes condiciones en el baño de agua durante la extracción	58
4.	CONCLUSIONES	60
5.	BIBLIOGRAFÍA	62



## INTRODUCCIÓN

El aroma de los quesos es una parte fundamental de su presentación e incluso de su sabor. El aroma está determinado principalmente por los componentes volátiles que se liberan en la cuajada y durante la maduración. De aquí que el análisis de los componentes volátiles del queso resulte de gran importancia. El aroma de un queso se debe en mayor parte a los ácidos grasos de cadena corta que a los de cadena larga, por lo que se espera una gran cantidad de estos compuestos.

En la actualidad el análisis de los componentes volátiles de diversas matrices, algunas muy complejas como el caso de los quesos, resulta complicado principalmente por la preparación de la muestra. Se han realizado análisis de compuestos volátiles de queso por diferentes técnicas, las cuales representan largo tiempo de análisis, alto costo, laboriosos métodos de preparación de muestra, etc.

Hoy en día se cuenta con una técnica de toma de muestra de componentes volátiles y semivolátiles rápida y eficiente. Esta técnica es la Microextracción en Fase Sólida (MEFS), que junto con la cromatografía de gases (CG) presenta ventajas para su análisis. La MEFS consiste en el reparto del analito entre la matriz y una fibra recubierta, la cual es expuesta a la muestra y el analito es extraído de la matriz. Una vez concentrado el analito en la fibra, éste es transferido al cromatógrafo de gases el cual, debido a la temperatura del inyector, se desorberá para ser analizado por CG. En este estudio se busca establecer las condiciones óptimas de la MEFS-CG en las cuales se presente la mayor eficiencia en la extracción de los componentes volátiles del queso, con el objeto de establecer una metodología rápida, eficiente, específica y barata para el análisis de estos componentes.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 El queso

México no tiene una gran tradición en la producción y consumo de queso, como algunos países europeos. Sin embargo, la presencia del queso en la cocina mexicana es indiscutible (1). La gran cantidad de quesos que existen actualmente, pero sobre todo sus diversas formas de elaboración, complican la definición de este nutritivo alimento. Algunas definiciones que se encuentran en la literatura son las siguientes:

- a) Las normas mexicanas describen al queso como el producto hecho de la cuajada obtenida de leche entera, semidescremada o descremada, de vaca o de otras especies animales, con adición de crema o sin ella, por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos u otra enzima apropiada con o sin tratamiento posterior de la propia cuajada por calentamiento, presión o por medio de los fermentos de maduración, mohos especiales o sazónamiento (2).
- b) Kosikowski define al queso como el resultado de la concentración selectiva de los componentes insolubles de la leche, en el cual intervienen el calor, la acidez, la sal y las bacterias lácticas, pudiéndose obtener un alimento fresco y aceptable, o bien, uno madurado por la acción de microorganismos y enzimas específicas (3).
- c) La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) lo define como el producto fresco o madurado obtenido después de la coagulación y separación del suero de la leche entera o parcialmente descremada (3).

Las diferentes definiciones de queso muestran lo complejo que es este alimento. La enorme variedad de quesos se debe en gran medida al número tan alto de procesos de elaboración.

Hoy en día existen mas de 400 tipos de quesos, los cuales pueden ser clasificados en 14 tipos de acuerdo a su contenido de humedad, textura, condiciones de maduración y cultivo de microorganismos utilizado como cultivo iniciador de la maduración. Existen por tanto quesos con características similares hechos en diferentes países como Roquefort en Francia, Blue en Estados Unidos, Stilton en Inglaterra y Gorgonzola en Italia (4). Las diferencias en los quesos, son las costumbres de manufactura de cada uno en su lugar de origen, por ello varios quesos han recibido el sello de denominación de origen, tal es el caso del queso Roquefort, que sólo puede ser llamado Roquefort si se madura en las cavas naturales de Mont Cobalou, en Roquefort, Francia.

En los quesos que se analizan en el presente trabajo y existen diferencias, tanto en el proceso de elaboración como en las condiciones y tiempo de maduración.

La Tabla 1 resume las diferencias y semejanzas en el proceso de elaboración de cada uno de ellos.

Tabla 1. Características de elaboración de los quesos analizados

Queso	Tipo de Leche	Microorganismo utilizado	Maduración, Tiempo y temperaturas.
Panela	Vaca	Ninguno	No hay maduración
Oaxaca	Vaca	Ninguno	15 días
Tipo Manchego	Vaca	No se tiene el dato	2-4 semanas
Chihuahua	Vaca	No se tiene el dato	2-4 semanas
Parmesano	Vaca	<i>Leuconostoc bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>S. lactis, S. cremoris</i>	2-4 años 5-10 °C
Cheddar	Vaca	<i>Cultivos mixtos de microorganismos lácticos</i>	9-12 meses a 7.2- 11°C
Roquefort ⊙	Oveja	<i>Penicillium Roqueforti</i> y <i>P. Glaucum</i>	5-10 meses a 1°C
Brie	Vaca	<i>Penicillium candidum</i> y <i>Bacillus linens</i>	4 semanas a 10-14°C y después 4 semanas a 8-10°C
Feta	Oveja, Oveja + cabra	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris.</i>	4 semanas a 10-14°C y después 4 semanas a 8-10°C
Gouda	Vaca	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	4-6 semanas a 15°C y después 6-12 semanas a 10°C
Edam	Vaca	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus diacetylactis</i>	3-4 semanas 12- 14°C
Manchego Español	Oveja	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i>	20- 90 días a 5 °C .

\* Datos obtenidos de R. Scoot. (5).

⊙ Queso Azul elaborado en las mismas características del queso Roquefort.

## 1.2 El aroma y los componentes volátiles en quesos

El aroma del queso es una parte fundamental de su presentación e indispensable en su sabor. El aroma está determinado principalmente por los componentes volátiles que se liberan en la cuajada y durante la maduración. Entre los compuestos volátiles más importantes para el aroma

se encuentran los aldehidos, las cetonas y los alcoholes, aunque también se pueden encontrar esteres y ácidos grasos, entre otros.

Las enzimas de los microorganismos que se encuentran activos en la cuajada, así como los metabolitos y los productos de degradación presentes son numerosos y dependerán también de las condiciones en las que se elabora cada tipo de queso. En gran parte, los componentes volátiles del queso son producidos por los microorganismos que pueden ser adicionados intencionalmente durante la elaboración o incluso ser un microorganismo indeseable; en ocasiones estos microorganismos producen ciertos compuestos paralelos con el producto principal y pueden influir en el aroma del queso (5).

La importancia de la grasa en el queso puede considerarse desde varios puntos de vista: por su aporte nutricional, por su influencia en las características estructurales y reológicas y por su participación en la formación del aroma. En cuanto a la formación del aroma del queso, debe tenerse en cuenta que la grasa de leche de la que se partió para su elaboración, se caracteriza por presentar una elevada concentración de ácidos grasos de cadena corta que pueden ser liberados en el transcurso de la maduración del queso, condicionando fuertemente su aroma (6).

Para el análisis del olor y sabor en los quesos se requiere de la evaluación sensorial de cada uno de ellos. La evaluación sensorial es el análisis de los alimentos u otros materiales por medio de los sentidos. Es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos y microbiológicos. La evaluación sensorial se lleva a cabo mediante los cinco sentidos.

Las propiedades sensoriales son los atributos de los alimentos que se detectan por medio de los sentidos. El olor es una propiedad detectada por medio de la nariz de sustancias volátiles liberadas en los alimentos. El sabor es otra propiedad sensorial detectada por medio de la boca. El color y la textura son otras dos propiedades que se evalúan con la vista y el tacto respectivamente, siendo estos importantes en la descripción de un alimento (7).

Los ácidos grasos libres han sido reconocidos como componentes que contribuyen fuertemente en las características de sabor de los quesos madurados (8). El aroma depende más del contenido de los ácidos grasos de cadena corta ( $C_4, C_6$  y  $C_8$ ) que de los de cadena larga. A pesar de ellos los ácidos grasos de cadena larga son un buen sustrato de enzimas que producen compuestos volátiles responsables del “bouquet”, los cuales se producen durante la maduración (5). Además de los ácidos grasos hay otros compuestos que contribuyen al aroma del queso como aminoácidos sulfurados, aldehídos, cetonas, ácido acético y mercaptanos, entre otros.

Existe la teoría del efecto sinérgico de los componentes que proporcionan el aroma en los quesos, siendo los compuestos sulfurados, aldehídos, cetonas y ácidos grasos libres los que generan entre ellos dicho efecto para darles un sabor característico, aumentando también la intensidad del sabor (9). El aroma en los quesos aparece debido a más de un componente (10). Para entender la respectiva contribución de cada uno de los componentes del aroma del queso, sería necesario describir la concentración de cada uno de ellos y compararlos con su nivel de umbral y de esta forma poder observar cualquier efecto sinérgico en el aroma (11).

Aunque la mayoría de los ácidos grasos son de cadena lineal, y son los que proporcionan principalmente la intensidad en el sabor, se ha sugerido que los ácidos grasos de cadena ramificada son los responsables del aroma a cabra y oveja, a pesar de que estos compuestos se encuentran en muy bajas concentraciones en quesos (8). Algunos estudios han mostrado la contribución de los ácidos 4-Metil-octanoico y 4-Metil-nonanoico al sabor de cordero, mientras que el ácido 4-etil octanoico es el responsable de muchos de los olores asociados a cabra macho de edad madura (12). Algunas notas de aroma de leche de vaca han sido atribuidas al *p*-cresol así como al Etil-fenol y Metil-fenol.

El umbral de sabor de algunos ácidos grasos libres de cadena ramificada es muy bajo comparado con el correspondiente ácido graso libre de cadena lineal. Por ejemplo el umbral del aroma del

ácido decanoico está reportado como 16 ppm, mientras que el 4-Etiloctanoico (también de 10 carbonos) ha sido reportado como 1.8 ppb. (13). Por esta razón es lógico esperar que en algunos análisis cromatográficos no se pueden detectar estos compuestos, pero si se perciban con el olfato.

Históricamente los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico han sido considerados los principales ácidos grasos de la leche de cabra, por lo que también se conocen como caproico, caprílico y cáprico, respectivamente. Sin embargo, se ha observado que ninguno de estos ácidos grasos puede por sí solo, producir un verdadero sabor a leche o grasa butírica de cabra (8). En el caso particular del queso Parmesano, se ha reportado que tiene un alto contenido de ácidos grasos de cadena corta así como también ácidos grasos de cadena ramificada, y se consideran importantes en su sabor (14), ya que se supone que son los que dan las notas típicas de sabor y aroma.

### **1.3 Los ácidos grasos**

Durante la maduración del queso los ácidos grasos libres pueden ser originados por tres diferentes vías bioquímicas: lipólisis, proteólisis y fermentación de lactosa. Las enzimas con actividad lipolítica pueden producir cadenas lineales de ácidos grasos, mientras que las enzimas proteolíticas son las responsables de la formación de ácidos grasos de cadenas ramificadas y finalmente durante la fermentación de lactosa se producen algunos ácidos orgánicos de cadena corta como ácido acético, propiónico y butanoico (14).

Existen cientos de productos lácteos, entre ellos al menos 400 tipos de quesos. Los datos de ácidos grasos en estos han sido avalados por diferentes análisis, pero no para la gran cantidad de productos lácteos bajos en grasa desarrollados recientemente. Los procesos y cambios que sufre la grasa en la elaboración de los quesos no deberían afectar la composición de ácidos grasos en la

nisma y de esta manera guardar la proporción original de dichos ácidos con respecto al contenido de grasa.

La mayor proporción de los lípidos de la leche son triglicéridos, seguidos de fosfolípidos. Los diglicéridos y monoglicéridos así como los ácidos grasos libres son solo una pequeña parte de la fracción lipídica de la leche. Los ácidos grasos libres, por ejemplo, representan solo el 0.28% del total de la grasa (4). Así entonces, los ácidos grasos de cadena corta solo se encuentran en bajas concentraciones en los quesos, pero son suficiente para dar aroma a estos.

Los ácidos grasos libres en productos lácteos pueden tener impacto positivo o negativo en el sabor y aroma, por lo tanto, el análisis de los ácidos grasos libres es usado como un indicador de calidad en varios de estos productos (9).

Los estudios realizados para identificar los ácidos grasos libres en leche han reportado mas de 400. Sin embargo, solo 10 de ellos se encuentran en una cantidad significativa y entre ellos están los ácidos Tetradecanoico, Dodecanoico, Decanoico y Butanoico.

La Tabla 2 muestra los ácidos grasos de cadena corta que contribuyen al aroma de los quesos.

Tabla 2. Ácidos grasos totales de cadena corta en algunos quesos.

ácido graso	Feta g/100g	Roquefort g/100g	Cheddar g/100g	Gouda g/100g	Edam g/100g	Parmesano g/100g
Butanoico	0.78	1.77	1.05	1.52	1.00	1.60
Hexanoico	0.57	0.71	0.53	0.59	0.46	0.54
Octanoico	0.57	0.75	0.28	0.38	0.30	0.35
Decanoico	1.98	2.29	0.60	0.86	0.59	0.83
Dodecanoico	1.11	1.33	0.54	1.02	0.5	0.99
Tetradecanoico	2.76	3.19	3.33	3.99	2.94	3.14
Hexadecanoico	5.15	6.75	9.80	9.59	8.07	8.11

Datos obtenidos de R.G. Jensen (4)

Como se mencionó anteriormente, la maduración es un proceso que influye en la concentración de ácidos grasos, ya que estos son liberados en la lipólisis. Se ha reportado que las concentraciones de los ácidos grasos de cadena corta que influyen en el sabor y aroma de queso



parmesano incrementan solo moderadamente durante la maduración, pero para evaluar apropiadamente los efectos de la elaboración de cada queso sobre el perfil de ácidos grasos debería hacerse también la comparación del perfil de la leche que origina al queso, pero esto aún no se ha reportado (4, 14).

Históricamente los ácidos grasos de cadena corta, han sido muy difíciles de analizar ya que se pueden perder muy fácilmente por ser solubles en agua y muy volátiles (4). Los métodos tradicionales de análisis de ácidos grasos libres involucran la conversión de ácidos grasos en su correspondiente éster metílico, para llevar a cabo su análisis (9), por ello, en este estudio se busca que la Microextracción en Fase Sólida (MEFS) elimine las dificultades para analizar los componentes volátiles y particularmente los ácidos grasos.

#### **1.4 Microextracción en Fase Sólida**

El análisis de los componentes volátiles de diversas matrices, algunas muy complejas como el caso de los alimentos, requiere de una toma de muestra que en ocasiones es muy lenta o muy laboriosa, además de costosa. En otros casos el uso de disolventes orgánicos puede causar variación en la interpretación de los resultados.

Las técnicas más comunes para el análisis de los componentes volátiles son Headspace (análisis del vapor confinado), Purga y Trampa (15) y Extracción de Fluido Supercrítico (16), pero estos métodos representan un alto costo, algunos con uso de disolventes y requieren largo tiempo de análisis. Se pueden incluir a estos métodos la Extracción por Membrana (17) y Extracción en Fase Sólida (18). Todos estos métodos con sus inconvenientes han sido usados comúnmente. Ahora se cuenta con un método que es libre de disolventes y el cual nos permite la extracción del analito y la desorción de éste dentro de un cromatógrafo de gases (CG) o un cromatógrafo de líquidos (CL) en un solo paso, método llamado Microextracción en Fase Sólida (MEFS). La

MEFS elimina algunas desventajas de las técnicas anteriores, siendo las más importantes: el tiempo requerido en la toma de muestra, la eliminación del uso de disolventes y el manejo excesivo de la muestra.

La MEFS consiste de dos pasos: primero el reparto de los analitos entre la fibra y la muestra y segundo la desorción de los analitos dentro del inyector del CG o CL. En el primer paso la fibra es expuesta a la muestra, los analitos son extraídos de la matriz y adsorbidos en la fibra (Figura 1). En el segundo paso la fibra con los analitos adsorbidos es entonces transferida a un instrumento (CG ó CL) para la desorción de los analitos, seguido del análisis y/o cuantificación de los compuestos desorbidos en el instrumento (19).

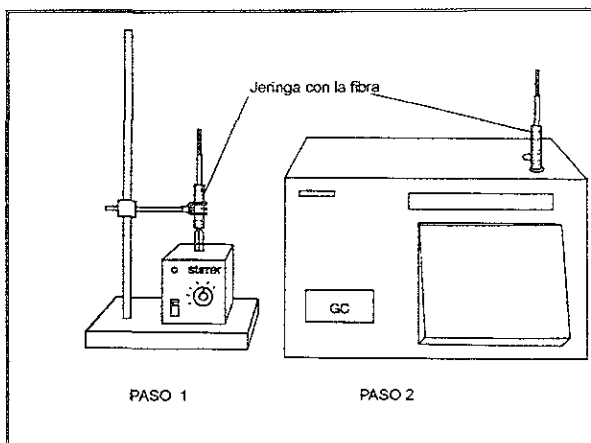


Figura 1. MEFS-CGC. Paso 1: equilibrio de los analitos entre la fibra y la muestra . Paso 2: transferencia de la fibra al instrumento analítico para desorber y analizar los analitos (paso 2).

En la MEFS no existe la posibilidad de que los compuestos volátiles se pierdan durante la extracción, ya que se utilizan viales herméticamente sellados con un tapón de silicón teflón.

Las fibras que se utilizan para la MEFS son de sílice fundida, químicamente inertes y estables a diferentes temperaturas, el tamaño pequeño y la geometría cilíndrica permite incorporarla dentro

de una jeringa, la cual puede ser operada como cualquier jeringa y fácilmente acomodada en el inyector del cromatógrafo (19) como se muestra en la Figura 2.

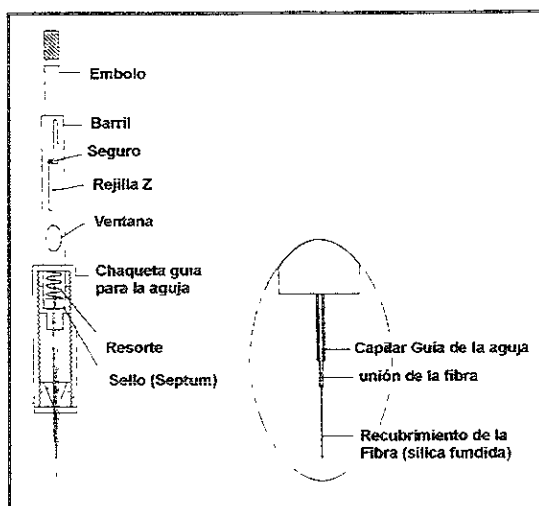


Figura 2. Diseño de la fibra para MEFS.

Debido a la diversidad de componentes que se pueden extraer de una matriz y se han diseñado varios tipos de fibra (20). Al igual que para los materiales de recubrimiento en las columnas capilares para CG, existe gran variedad de fibras para MEFS. Los tipos de fibras comerciales pueden clasificarse en polares, semipolares y no polares. Entre las fibras no polares se encuentra la de polidimetilsiloxano (PDMS), entre las semipolares la de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), mientras que para las fibras polares encontramos poliacrilato (PA) y Carbowax-Divinilbenceno (21). Como consecuencia de los diferentes tipos de fibra con diferentes polaridades, la MEFS presenta las siguientes ventajas: existe una extracción selectiva hacia analitos específicos, reduce la posibilidad de extraer interferencias y puede extraer compuestos polares de matrices orgánicas.

La MEFS es un proceso de equilibrio en varias etapas. Frecuentemente los sistemas de extracciones son muy complejos, para simplificar el sistema, solo tres fases deben de ser consideradas en la MEFS: el recubrimiento de la fibra, la fase vapor o “Headspace”, y la matriz o muestra. Durante la extracción, los analitos migran entre las tres fases hasta alcanzar un equilibrio (22).

Una de las formas más eficientes de disminuir las limitaciones de la cinética de reparto de analitos entre la fibra y la muestra es el aumento de temperatura de la muestra, lo cual incrementa la presión de vapor de los analitos, disminuyéndose así el tiempo de extracción (23). Alternativamente, a través de una modificación en la técnica de MEFS que permite enfriar la fibra durante la extracción mientras que la muestra es calentada, el mantener la fibra a bajas temperaturas permite al muestreo incrementar la cantidad de analitos extraídos por la fibra (24).

Para establecer una metodología por Microextracción en Fase Sólida para la determinación de componentes volátiles y semivolátiles se deben determinar los siguientes parámetros: tiempo óptimo de extracción, tiempo óptimo de desorción de la fibra, temperatura óptima y agitación de la muestra durante la extracción.

Las aplicaciones de la MEFS se han enfocado a la extracción de compuestos de diversas matrices, como aire y agua, Sin embargo, recientemente se han utilizado para alimentos (jugos, sabores) y fármacos ( análisis de cafeína en té y café) (19). Se han aplicado diferentes técnicas analíticas para el aislamiento y estudio de los componentes volátiles, por ejemplo destilación-extracción simultánea (EDS), destilación molecular, “Headspace” dinámico y extracción con disolventes (25). Sin embargo, ninguno de estos métodos ofrece la solución perfecta para el análisis de volátiles. Por ejemplo, durante la EDS y extracción con disolventes pueden concentrarse los contaminantes del disolvente cuando el extracto se reduce de volumen antes del análisis por CG, provocando interferencias en este análisis. En otros casos, pueden perderse

algunos compuestos volátiles durante la concentración. En el caso de la destilación, debido a las altas temperaturas se pueden producir compuestos diferentes a los compuestos originales (19).

Para el análisis de los compuestos volátiles de los quesos la MEFS es una técnica eficiente, además de sencilla y de bajo costo.

### **1.5 Cromatografía de gases (CG)**

La CG es utilizada ampliamente en el análisis de lípidos en diferentes matrices. En muchos casos, el análisis por CG se realiza sobre especies moleculares intactas y volátiles. Sin embargo, especies no muy volátiles y sustancias térmicamente inestables, también pueden analizarse con un previo tratamiento de la muestra (derivatización) (26).

Con excepción de los análisis de algunos compuestos de alto peso molecular, la cromatografía de gases ha jugado un papel importante en el análisis de lípidos encontrados en matrices biológicas.

Otras técnicas que pueden ser usadas son la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y la cromatografía de fluidos supercríticos (CFS). Sin embargo, existe una limitante para esta última y es el alto costo del equipo, comparado con los equipos de CG y CLAE (26). La CG ha sido la técnica más comúnmente usada para el análisis de los componentes volátiles de queso. Sin embargo, generalmente estos componentes del aroma se presentan en cantidades traza y se requiere del aislamiento y concentración para poder llevar a cabo el análisis cromatográfico (25).

Las columnas capilares usadas en cromatografía de gases capilar (CGC) son las más usadas hoy en día para el análisis de lípidos. Este tipo de columnas presenta varias ventajas en los análisis como son: alta eficiencia y de aquí su alto poder de resolución, alta sensibilidad y compatibilidad con sistemas acoplados como CG-EM, CGC-FTIR (26). Además de ser compatible también con la MEFS. La CG es el método de mayor eficiencia y selectividad que se pueda encontrar para el análisis de matrices complejas.

Se han reportado trabajos de la determinación de la fracción volátil del queso para su clasificación y diferenciación entre distintas variedades, usando la CGC junto con la previa extracción y derivatización de los ácidos grasos de la matriz (27).

La CGC además de su alta eficiencia y rapidez de análisis, tiene la ventaja de trabajar con detectores universales y específicos. El detector de ionización de flama (DIF) es usado como detector en la mayoría de los análisis de lípidos, ya que estas moléculas contienen por lo general solamente carbono, hidrógeno y oxígeno y la respuesta en este detector es proporcional al contenido de carbono unido a hidrógeno en la molécula (6). Por todo ello la cromatografía de gases capilar (CGC) junto con la MEFS es una excelente opción para llevar a cabo el análisis de los componentes volátiles del queso.

## **2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1 Materiales y reactivos**

Quesos nacionales: Tipo Manchego, Oaxaca, Chihuahua ( Marca Volcanes).

Quesos importados: Parmesano (Italia), Feta (Grecia), Cheddar (Estados Unidos), Roquefort (Dinamarca), Brie (Francia), Gouda (Holanda), Edam (Holanda), Manchego (España) Todos adquiridos en el supermercado, (Tabla 1).

Fibra para inyección manual de poliacrilato (PA) y de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), SUPELCO. Supelco Park. Bellefonte, PA. USA.

Estándares de ácidos grasos: butanoico (C<sub>4</sub>), hexanoico (C<sub>6</sub>), heptanoico (C<sub>7</sub>), octanoico (C<sub>8</sub>), nonanoico (C<sub>9</sub>), decanoico (C<sub>10</sub>), dodecanoico (C<sub>12</sub>). SIGMA Grado cromatográfico 99-100%.

Frascos de vidrio de capacidad de 90 mL con tapón de rosca de baquelita horadado y septum de silicón-Teflón.

Viales de vidrio de capacidad de 10 mL con tapón de rosca de Baquelita horadado y septum de silicón-Teflón.

Parrilla de calentamiento con agitador magnético, Thermoline, Type 1000 (Stir Plate).

### **2.2 Evaluación sensorial**

Se realizaron pruebas descriptivas para cada uno de los quesos, lo cual consistió en lo siguiente: se eligieron 3 jueces que cursaran la asignatura de análisis sensorial, para describir los atributos sensoriales olor, sabor, textura y color de cada uno de los quesos. Las pruebas se realizaron el mismo día que se analizó el queso por MEFS-CG. En este caso solo se trato de describir a grandes rasgos las características y atributos sensoriales de cada uno de los quesos en estudio, por

ello no se requirió de jueces entrenados para evaluar los quesos, y solo se buscó algunos jueces que tuvieran los conocimientos básicos de evaluación sensorial.

### **2.3 Determinación de las Condiciones cromatográficas**

Con el objeto de establecer el mejor programa de temperaturas para el análisis de compuestos volátiles se establecieron diferentes programas y para ello se utilizó un cromatógrafo de gases HP5880, con una columna capilar de sílice fundida 30m x 0.32mm x 1µm, SP1000 (SUPELCO) y un detector de ionización de flama (DIF) inyector con división de flujo (“split”) y sin división de flujo (“splitless”), gas acarreador H<sub>2</sub>. En todos los casos se inyectó 1µL de una disolución estándar de una mezcla de ácido acético, butanoico, hexanoico, heptanoico, octanoico, nonanoico, decanoico y dodecanoico, además de etanol.

- Programa 1: Temperatura inicial 40 °C durante 1 minuto, aumentando la temperatura a 10°C por minuto hasta 220°C por 10 minutos.
- Programa 2: Temperatura inicial 100 °C durante 1 minuto, aumentando la temperatura a 10°C por minuto hasta 220°C por 15 minutos.
- Programa 3: Temperatura inicial 120 °C durante 1 minuto, aumentando la temperatura de 10°C por minuto hasta 220°C por 15 minutos.
- Programa 4: Temperatura inicial 100 °C isotérmico durante 20 minutos.

En los 4 programas de temperatura que se estudiaron se mantuvo la temperatura del inyector y la del detector a 220°C.

Se encontró que las mejores condiciones para el análisis de compuestos volátiles en quesos fueron las descritas en el Programa 3, por lo que todos los análisis cromatográficos se realizaron bajo estas condiciones.



## **2.4 Preparación de la muestra**

Las orillas del queso se eliminaron para minimizar cualquier parte de la muestra en la cual los componentes volátiles pudieran haberse escapado hacia el material de empaque. Las muestras de queso se cortaron finamente con un cuchillo. Se pesaron aproximadamente 100 gramos en el caso del queso nacional o 60 gramos en el caso del queso importado. Cada muestra se colocó en un frasco de vidrio de 90 mL. El frasco se cerró herméticamente con un tapón de rosca de bakelita horadado, con un septum de silicón-teflón en el centro del tapón. Posteriormente, la muestra se colocó en un horno a 60°C para establecer el equilibrio de la muestra con la fase vapor.

## **2.5 Determinación de la temperatura del análisis de la muestra.**

Para determinar la temperatura del análisis de la muestra se realizaron dos experimentos. En el primero durante la extracción se mantuvo la muestra en baño María a 60°C±5°C y el segundo experimento se realizó sin el baño María. Estos dos experimentos se llevaron a cabo para observar las condiciones en las cuales se lograba una mejor extracción. Para ello se realizó lo siguiente:

En el primer experimento una muestra de queso nacional tipo Manchego se colocó en un horno a 60°C durante 30 minutos para establecer el equilibrio de los analitos entre la muestra y la fase vapor (Headspace). Después de este tiempo la muestra se sacó del horno y se introdujo la fibra durante 30 minutos en el frasco para la extracción e inmediatamente después se introdujo la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases durante 10 minutos.

En el segundo experimento una muestra de queso nacional tipo Manchego también se colocó en el horno a 60°C durante 30 minutos y después se colocó en baño María para mantener esta temperatura durante la extracción, se insertó la fibra en el frasco durante 30 minutos e

inmediatamente después se introdujo la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases durante 10 minutos.

## **2.6 Determinación del tiempo de extracción.**

Para elegir el tiempo en el cual la extracción tenía una mayor eficiencia, se determinaron 3 tiempos de extracción. Los tiempos de extracción estudiados fueron: 30, 60 y 90 minutos. Para cada uno de los tiempos se realizó la determinación utilizando el siguiente procedimiento: una muestra (100 gramos) de queso nacional tipo Manchego se colocó en horno a 60°C durante 30 minutos y después en un baño María para mantener esta temperatura durante la extracción, se introdujo la fibra en el frasco durante 30 minutos e inmediatamente se insertó la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases durante 10 minutos (inciso 2.5). El mismo procedimiento se repitió para los tiempos de extracción de 60 y 90 minutos.

## **2.7 Determinación del tiempo de desorción.**

Con el objetivo de conocer el tiempo de desorción de la fibra en el inyector del cromatógrafo de todos los compuestos volátiles adsorbidos, se realizaron dos experimentos a diferentes tiempos de desorción. Estos tiempos fueron 5 y 10 minutos y para ello se realizó lo siguiente:

Se siguió el procedimiento de extracción descrito anteriormente en el inciso 2.6 utilizando un tiempo de extracción de 90 minutos y 5 minutos de desorción.

Después de este análisis se determinó un blanco de la fibra. Esto se realizó inyectando nuevamente la fibra sin previo acondicionamiento durante otros 5 minutos con el fin de observar si se había desorbido todos los compuestos de la fibra o aún tenía compuestos adsorbidos. El mismo procedimiento se realizó para el tiempo de desorción de 10 minutos, corriendo posteriormente su respectivo blanco de fibra.

## **2.8 Identificación de compuestos volátiles**

### **2.8.1 Identificación de compuestos**

La identificación de los componentes volátiles de las muestras se realizó comparando sus tiempos de retención con los obtenidos en la mezcla estándar de ácidos grasos (sección 2.3)

### **2.8.2 Cromatografía de gases Espectrometría de masas (CG-EM)**

Para confirmar los compuestos identificados en el cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (FID), se analizó el extracto de una muestra de queso Parmesano y queso Roquefort con el procedimiento descrito en el inciso 2.6. Para ello se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 acoplado a un detector selectivo de masas HP 5971. la columna capilar SPB™ de SUPELCO. 30m x 25mm x 25µm. El modo de inyección fue “splitless” (1min); el gas acarreador fue Helio; Temperatura de la línea de transferencia en modo “SCAN” de 280°C. Programa de temperatura: Temperatura inicial: 60°C durante 1 minuto. Incremento de temperatura: 10 °C por minuto. Temperatura final : 280°C durante 10 minutos. Temperatura del inyector: 250 °C. “splitless” 1 minuto.

## **2.9 Determinación de compuestos volátiles de quesos**

Ya establecidas las condiciones óptimas de la MEFS y CG, para el queso nacional tipo Manchego, se procedió al análisis de los otros quesos en estudio.

Se analizaron los quesos restantes bajo las condiciones de temperatura encontradas para la muestra durante la extracción inciso 2.5 (Baño a 60°C durante la extracción), tiempo de extracción inciso 2.6 (90 minutos), tiempo de desorción (10 minutos) inciso 2.7.

Se realizaron 5 análisis para cada uno de los quesos Nacionales y 3 análisis para cada uno de los quesos importados, esto es debido al alto costo de los quesos importados y en algunos casos la dificultad para conseguirlos se decidió hacer solo 3 análisis de cada uno de ellos.

## **2.10 Determinación de la precisión del método**

Se preparó una disolución Estándar concentrada de ácidos grasos en agua desionizada: Butanoico (0.2187mg/mL) , Hexanoico (0.0105mg/mL), Heptanoico (0.0518mg/mL), Octanoico (0.1322mg/mL), Nonanoico (0.6330mg/mL) y Dodecanoico (0.2440mg/mL).

De esta disolución se midieron alícuotas de 5 mL y se colocaron en un vial de vidrio con capacidad de 10 mL. Se introdujo en el vial un agitador magnético y se selló con el tapón de rosca de bakelita horadado con septum de silicón-teflón. La muestra se calentó en un horno a  $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, después de este tiempo se extrajo con la fibra durante 15 minutos se mantuvo la muestra con agitación y en baño María a  $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Una vez transcurridos los 15 minutos de extracción se desorbió la fibra en el CG durante 10 minutos. Se realizaron 11 determinaciones bajo las mismas condiciones.

## **2.11 Efecto de la polaridad de la fibra.**

Para determinar el efecto de la polaridad de la fibra en la extracción de los compuestos volátiles de queso, se utilizó la fibra PDMS-DVB, la cual es considerada como semipolar. En una muestra de queso Manchego Español se realizó el mismo procedimiento de extracción (inciso 2.9) de compuestos volátiles que se utilizó con la fibra PA (polar), solo que en este caso se usó una fibra de PDMS-DVB (semipolar).

## **2.12 Análisis con enfriamiento de la Fibra**

Otro de los parámetros que puede afectar la extracción es la temperatura de la fibra durante la extracción, por lo que se repitió el procedimiento de extracción descrito en 2.9 solo que en este experimento se realizó el enfriamiento de la fibra por 30 minutos antes de realizar la extracción,

exponiendo la fibra fría en la muestra. En este caso la muestra fue queso Roquefort y paralelamente se hizo un experimento con el procedimiento normal de extracción (inciso 2.9)

### **2.13 Análisis con diferentes condiciones en el baño de agua durante la extracción**

Otra de las variables del experimento fue realizar la extracción con el baño de la muestra. Esta se realizó con el procedimiento descrito en 2.9, solo que en este caso, el baño María usado durante la extracción se mantuvo en la parte inferior del frasco (cubriendo la muestra) y manteniendo la fase vapor (headspace) sin calentamiento en baño María. Paralelamente se hizo un experimento con el procedimiento normal de extracción (inciso 2.9) con el mismo queso.

### **2.14 Determinación de acetaldehído.**

El análisis para la determinación de acetaldehído se realizó en los siguientes quesos: Parmesano, Roquefort, Feta y Manchego Español. Se eligió el queso Parmesano porque se encontró reportado en la literatura que éste lo contenía (8), los otros 3 se eligieron porque de los quesos analizados, son los que tienen una mayor cantidad de compuestos volátiles, lo que nos hizo pensar que podría tener acetaldehído.

En un vial ámbar se colocaron 2 mL de Penta-fluoro-bencil-hidroxilamina (PFBHA) y se agitó durante 5 minutos a 1200 rpm, después, se expuso la fibra de PDMS-DVB al vial con (PFBHA) durante 5 minutos manteniendo la agitación. Una vez cargada la fibra con el reactivo se insertó durante 15 minutos en la muestra, que previamente se había preparado como se describió en el inciso 2.4. Posteriormente se realizó la inyección de la fibra en el cromatógrafo de gases, manteniéndola dentro del inyector durante 5 minutos para la desorción de los analitos y su análisis.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Análisis sensorial de quesos

Se realizó la evaluación sensorial de cada uno de los quesos analizados. Los jueces describieron sus principales características como sabor, aroma y textura como se describe en el inciso 2.1 las cuales se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3 Evaluación sensorial de los quesos analizados

Característica sensorial	Textura	Olor	Sabor	Color
Panela	Suave blando, jugoso, sin ojos firme.	Muy tenue a leche	Suave, parecido a la leche	Blanco
Oaxaca	Blando, muy firme y elástico	Tenue a leche,	Leche, con resabio de leche	Amarillo tenue
Tipo Manchego Nacional	Homogéneo, firme, sin ojos.	A leche más intenso.	Leche, con resabio inicial de leche seguido de resabio amargo tenue	Amarillo
Chihuahua	Firme, suave textura, sin ojos, con corteza más dura	A leche semejante al manchego en intensidad	Leche intenso con notas de resabio amargo	Amarillo
Parmesano	Corteza muy dura, seco, sin ojos y muy compacto.	Poco aroma a leche, ligeramente picoso, fuerte aroma	Sabor a leche intenso, con sabor fuerte.	Amarillo
Cheddar	Compacto, sin ojos, muy blando. Homogéneo	Tenue olor da leche, dulce, muy suave	Inicial a leche con resabio ligeramente amargo	Amarillo
Roquefort	Blando, con muchos ojos, quebradizo, cremoso	Picante, fuerte, aroma muy penetrante	Muy amargo, intenso sabor de leche pero muy amargo y picante.	Blanco, con abundantes hongo gris oscuro.
Feta	Firme, sin ojos, jugoso.	Intenso a leche pero fuerte y amargo, picante	Fuerte, amargo, ácido, hasta un poco agrio	Blanco.
Brie	Compacto, muy cremoso, corteza firme, sin ojos	Suave, de leche pero con notas picantes, pungente	Sabor de leche intenso, cremoso, resabio muy amargo	Color crema, o amarillo opaco
Gouda	Corteza firme, centro suave, compacto	Suave, tenue aroma de leche.	Leche intenso, con resabio amargo.	Amarillo
Edam	Corteza firme, centro suave, cremoso, con pequeños ojos	Suave, notas a leche intensa	Suave al inicio, intenso a leche con resabio amargo	Amarillo
Manchego Español	Duro, corteza muy dura, seco.	Aroma muy fuerte, picante.	Fuerte sabor amargo, poco picante.	Amarillo

### 3.2 Desarrollo y optimización de un método por MEFS.

#### 3.2.1. Condiciones cromatográficas.

Con el fin de obtener un programa de temperaturas que permitiera una buena resolución en el menor tiempo de análisis para los compuestos volátiles de los quesos, se evaluaron 4 diferentes programas de temperatura. La tabla 4 muestra las condiciones de cada uno de los programas evaluados.

Tabla 4. Condiciones de los programas de temperaturas evaluados.

Programa	1	2	3	4
Temperatura inicial	40°C	100°C	120°C	100°C
Tiempo inicial	1 minuto	1 minuto	1 minuto	20 minutos
Incremento de temperatura	10°C/minuto	10°C/minuto	10°C/minuto	---
Temperatura final	220°C	220°C	220°C	---
Tiempo final	10 minutos	15 minutos	15 minutos	---
Tiempo total de análisis	29 minutos	28 minutos	26 minutos	20 minutos

Las Figuras 3-6 muestran los cromatogramas de estándares de ácidos grasos obtenidos con las condiciones cromatográficas estudiadas y descritas en 2.3

Como se puede observar en la Figura 3 (Programa 1) se tiene una buena resolución para todos los ácidos grasos. Sin embargo, debido a que este programa inicia a 40°C, requiere un largo tiempo de análisis (29 minutos) para poder eluir el ácido dodecanoico, que es el de mayor tiempo de retención de los estándares analizados. Lo cual representa una desventaja en los análisis cromatográficos ya que generalmente se busca que el análisis se realice en el menor tiempo posible.

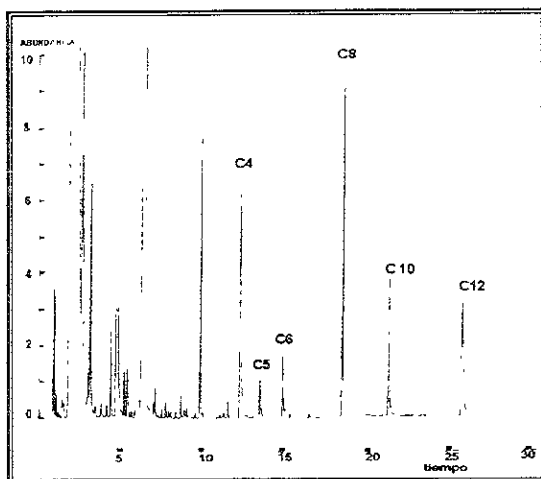


Figura 3. Cromatograma de una mezcla de estándares de ácidos grasos. Programa 1. Temperatura inicial 40°C/1 minuto, incremento de temperatura 10°C/minuto, temperatura final 220°C/10 minutos. Tiempo de análisis 29 minutos.

La Figura 4 muestra el cromatograma obtenido con el Programa 2 y se observa buena resolución de los ácidos grasos de la mezcla estándar y el tiempo de análisis no es demasiado largo (28 minutos).

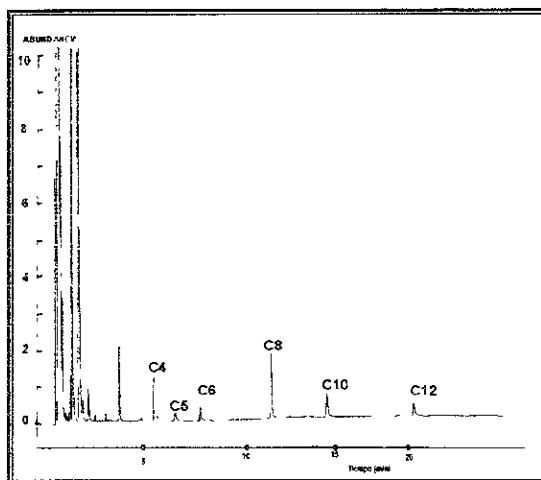


Figura 4 Cromatograma de una mezcla de estándares de ácidos grasos. Programa 2. Temperatura inicial 100°C/1 minuto, incremento de temperatura 10°C/minuto, temperatura final 220°C/15 minutos. Tiempo de análisis 28 minutos.



En la Figura 5 se muestran el cromatograma obtenido con el Programa 3. La temperatura inicial fue de 120°C y se obtuvo una buena resolución de los ácidos grasos, tal como en el caso anterior, solo que en este caso el tiempo total de análisis es menor (26 minutos), lo que es preferible, ya que teniendo ambos programas una buena resolución, optamos por el de menor tiempo.

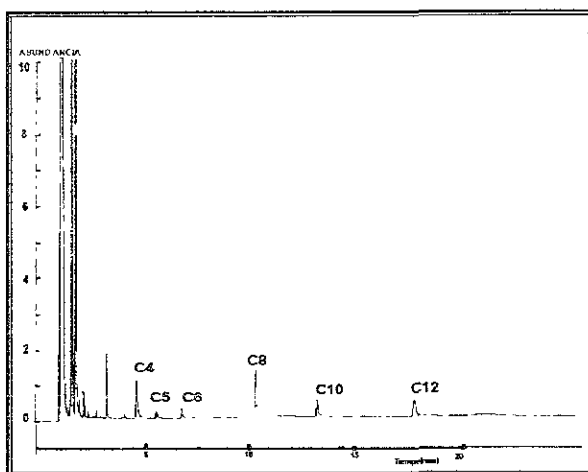


Figura 5. Cromatograma de una mezcla de estándares de ácidos grasos. Programa 3. Temperatura inicial 120°C/1 minuto, incremento de temperatura 10°C/minuto, temperatura final 220°C/15 minutos. Tiempo de análisis 26 minutos

Con el propósito de reducir aun más el tiempo de análisis se realizó un análisis isotérmico a 220°C (Figura 6). La resolución de los ácidos grasos, sobre todo los de cadena mas corta (C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>6</sub>) no fue aceptable, ya que se juntan, y aunque se obtiene el de menor tiempo de análisis (20 minutos), no resultó ser el óptimo para la determinación de los componentes volátiles de queso.

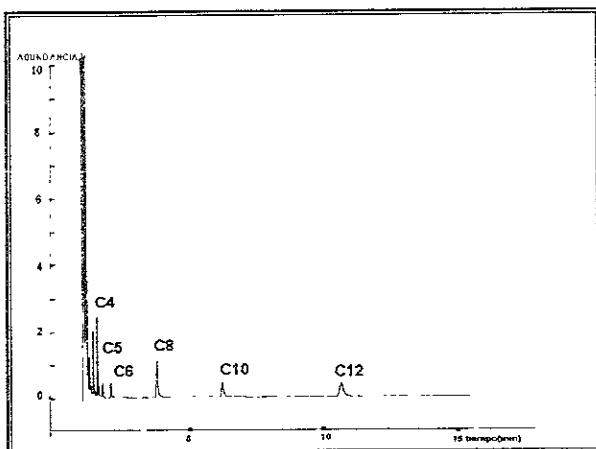


Figura 6. Cromatograma de una mezcla de estándares de ácidos grasos. Programa 4 Programa isotérmico Temperatura 100°C durante 20 minutos.

De acuerdo a estos resultados el mejor programa de temperatura para el análisis de los compuestos en estudio fue el Programa 3 (Figura 5) ya que se obtuvo una buena resolución entre todos los compuestos en el menor tiempo de análisis (26 minutos).

### 3.2.2. Determinación de la temperatura del análisis de la muestra

La Figura 7 muestra el cromatograma del extracto de la muestra de queso tipo Manchego Nacional analizado sin mantener la temperatura a 60°C durante la extracción aparece una señal a 4 minutos que no corresponde a un ácido graso y la Figura 8 muestra el análisis del mismo queso, pero manteniendo la temperatura de 60°C durante la extracción.

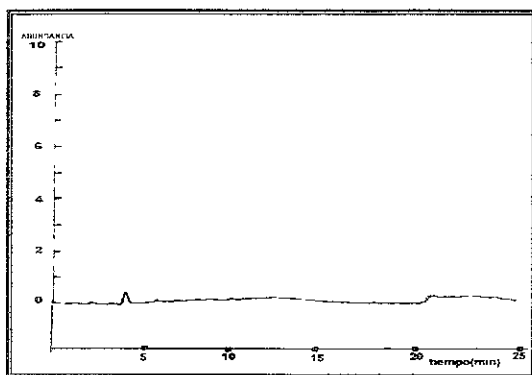


Figura 7. Cromatograma del extracto de queso tipo Manchego nacional, extracción durante 30 minutos sin mantener la muestra en el baño María durante la extracción (extracción a temperatura ambiente).

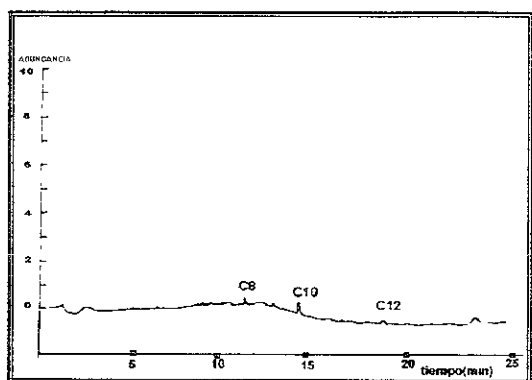


Figura 8. Cromatograma del extracto de queso tipo Manchego nacional, extracción durante 30 minutos manteniendo la muestra en el baño María en el frasco con muestra a 60°C durante la extracción.

Como podemos observar, se obtiene una mejor extracción cuando se mantiene la muestra a 60 °C durante la extracción. Esto puede deberse a que cuando se mantiene la temperatura, los compuestos permanecen en la fase vapor, se logra su adsorción en la fibra, mientras que si no se mantiene la temperatura durante la extracción es probable que los compuestos volatilizados, con el calentamiento en el horno, regresan a la matriz conforme la temperatura desciende, haciendo que la concentración de volátiles en la fase vapor disminuya y por lo tanto se obtenga una menor

extracción. Por lo tanto se decidió que los análisis que se hacían a temperatura mantenida a 60 °C serían las condiciones de temperatura para el análisis

### 3.2.3. Tiempo de extracción

La Tabla 5 muestra los valores en unidades de área para el análisis de queso tipo Manchego nacional por MEFS a diferentes tiempos de extracción.

Tabla 5. Valores en unidades de área para cada uno de los ácidos grasos detectados en queso tipo manchego, a diferentes tiempos de extracción.

Ácido graso	Tiempo de extracción		
	30 minutos	60 minutos	90 minutos
Butanoico	ND	0.28	0.85
Hexanoico	ND	0.72	1.55
Octanoico	0.63	2.21	4.36
Decanoico	2.74	5.18	6.6
Dodecanoico	0.56	1.56	2.06

ND ácido graso no detectado en el análisis.

Como se puede observar en la tabla 5 Conforme aumenta el tiempo de extracción aumenta la respuesta en el cromatograma. Sin embargo, más de 90 minutos de extracción sería un tiempo demasiado largo, por lo que éste fue el tiempo máximo de extracción que se utilizó para el análisis de los otros quesos en estudio. Por otro lado, podemos ver que la concentración de volátiles en el queso tipo Manchego nacional ( el cual se utilizó para la optimización del método), es muy baja, por lo que no se llegó a la saturación de la fibra. Sin embargo, fue suficiente para detectar los ácidos grasos libres presentes en este queso. Cabe señalar que la concentración de los ácidos grasos en este queso es baja. sin embargo en el estudio de los quesos elegidos estaban contemplados quesos con mayor tiempo de maduración, de los cuales se esperaba mayor concentración de ácidos grasos libres, por lo que este tiempo de extracción sería suficiente para su análisis.

Las Figuras 9, 10 y 11 muestran los análisis de las extracciones de compuestos volátiles en queso tipo Manchego nacional a diferentes tiempos: 30, 60 y 90 minutos respectivamente.

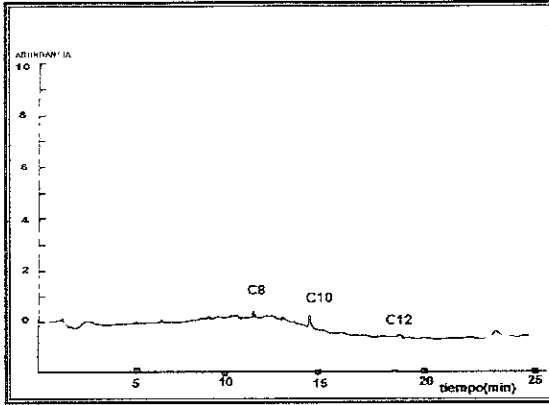


Figura 9. Análisis de queso tipo Manchego nacional por MEFS-CG Extracción con la fibra durante 30 minutos. Manteniendo la muestra en el baño María a 60°C.

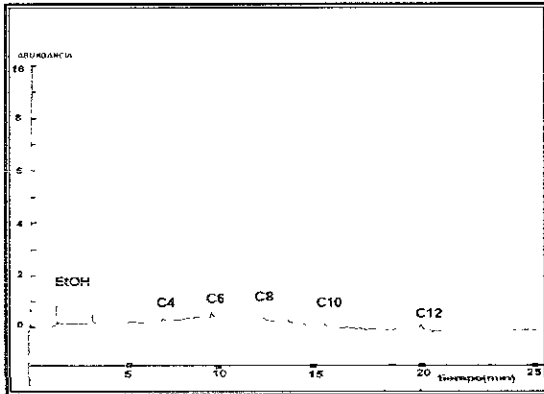


Figura 10. Análisis de queso tipo Manchego nacional por MEFS-CG. Extracción con la fibra durante 60 minutos. Manteniendo la muestra en el baño María a 60°C.

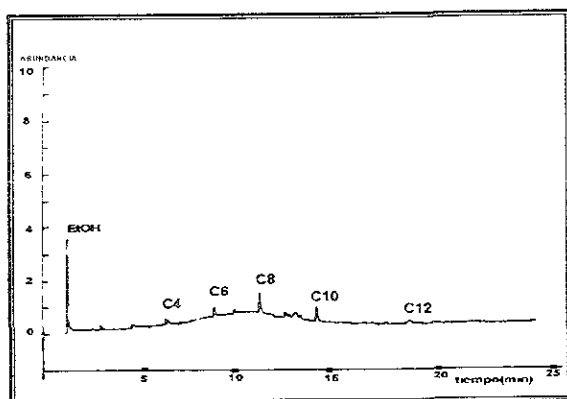


Figura 11. Análisis de queso tipo Manchego nacional por MEFS-CG. Extracción con la fibra durante 90 minutos. Manteniendo la muestra en el baño María a 60°C

### 3.2.4. Tiempo de desorción

En los métodos de MEFS es importante conocer el tiempo al cual la fibra después de una extracción, ha desorbido todos los compuestos en el inyector del CG, ya que de esto depende el identificar todos los compuestos extraídos y evita interferencias en los siguientes análisis pues la fibra queda limpia y acondicionada para una siguiente extracción. En los estudios cuantitativos, es importante hacer una desorción completa en la fibra, ya que de lo contrario se obtendría error en los resultados.

Para determinar el tiempo que tardaba la fibra en desorber todos los compuestos adsorbidos durante la extracción, se utilizaron dos diferentes tiempos de desorción como se describió en 2 8 Las Figuras 12 y 13 muestran los cromatogramas obtenidos del blanco de fibra para tiempos de desorción de 5 y 10 minutos, respectivamente.

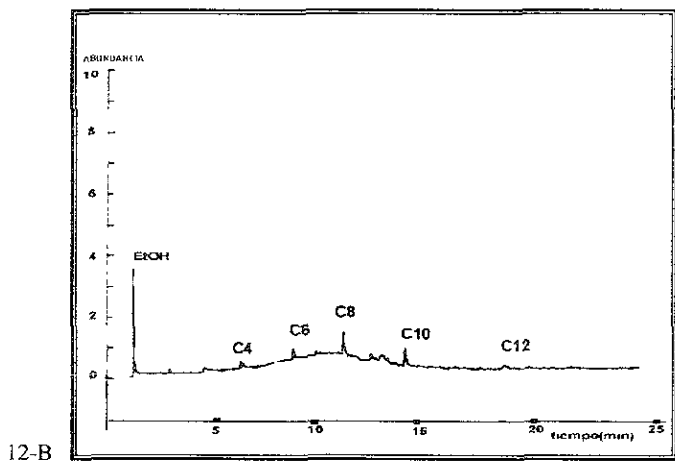
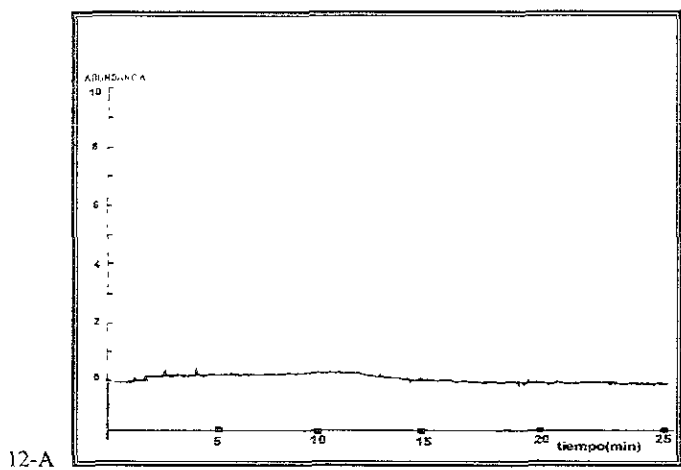


Figura 12. Blanco de Fibra (12-A), después de un análisis de volátiles de queso con un tiempo de desorción de fibra de 5 minutos (12-B).

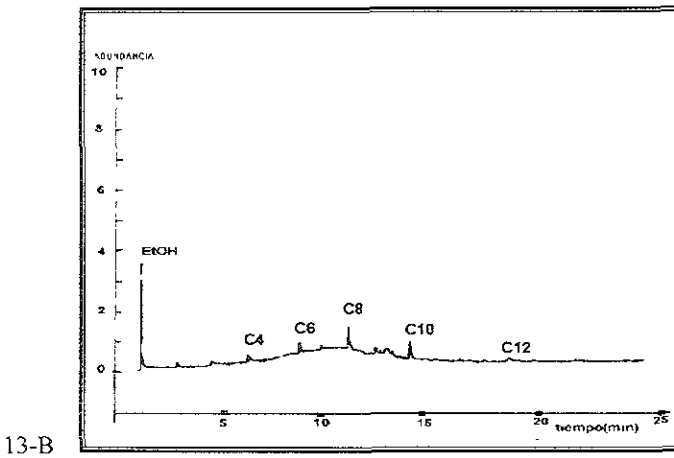
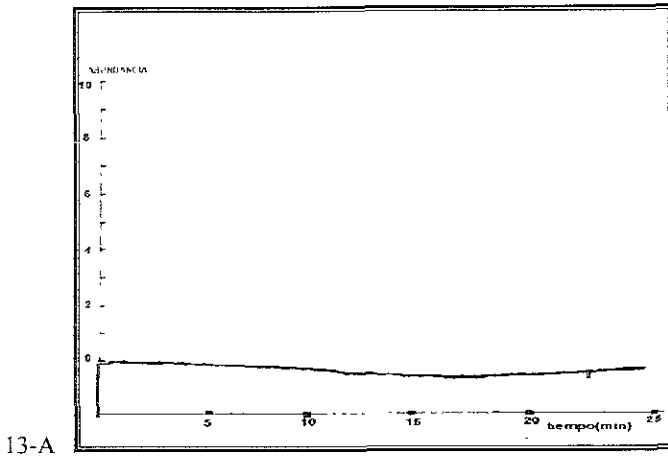


Figura 13. Blanco de Fibra (13-A), después de un análisis de volátiles de queso con un tiempo de desorción de fibra de 10 minutos (13-B).

Como podemos observar, cuando la fibra se desorbe únicamente 5 minutos en el análisis del queso, algunos compuestos quedan adsorbidos en la fibra, los cuales se desorben en la segunda inyección (blanco) observados en la figura 12-B. Mientras que para el caso de 10 minutos de



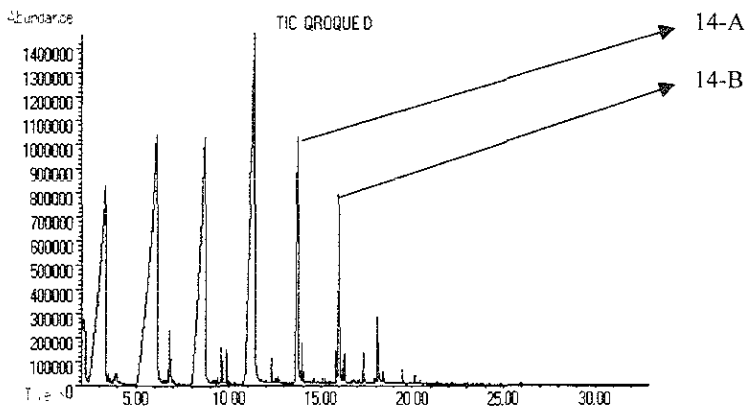
desorción en el análisis del queso, al realizar el blanco, se puede ver que todos los compuestos han sido desorbidos desde la primera desorción, ya que el cromatograma no presenta ningún otro pico como se observa en la figura 13-B.

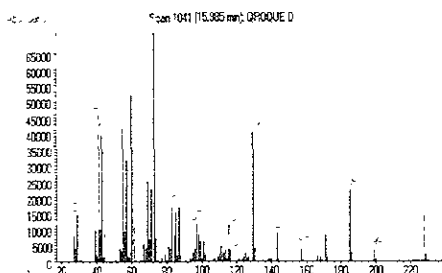
### 3.3 Identificación de los compuestos volátiles por CG-EM

Para confirmar los compuestos volátiles presentes en los quesos, se realizaron análisis de queso Parmesano y Roquefort por MEFS-CG/EM con el procedimiento descrito en 2.8.2

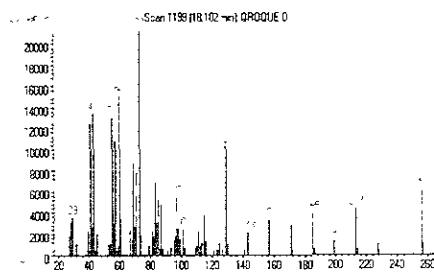
Se encontró que los ácidos grasos identificados en CG/EM corresponden a los identificados anteriormente por CG con detector de ionización de flama logrando identificar ácidos butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico, dodecanoico, tetradecanoico e incluso el ácido hexadecanoico en el queso Roquefort.

En la figura 14 se muestra la confirmación de la presencia del ácido tetradecanoico y el ácido hexadecanoico.





14-A



14-B

Figura 14. Cromatograma iónico total. Queso Roquefort. En recuadro se presenta el espectro de masas del ácido tetradecanoico (14-A) y hexadecanoico (14- B)

Finalmente, en la Figura 15 se muestra la comparación del espectro obtenido para el ácido hexadecanoico(15-A), con el espectro registrado en la biblioteca de la computadora (15-B) De este modo se confirmó la identificación de todos los ácidos presentes en los quesos.

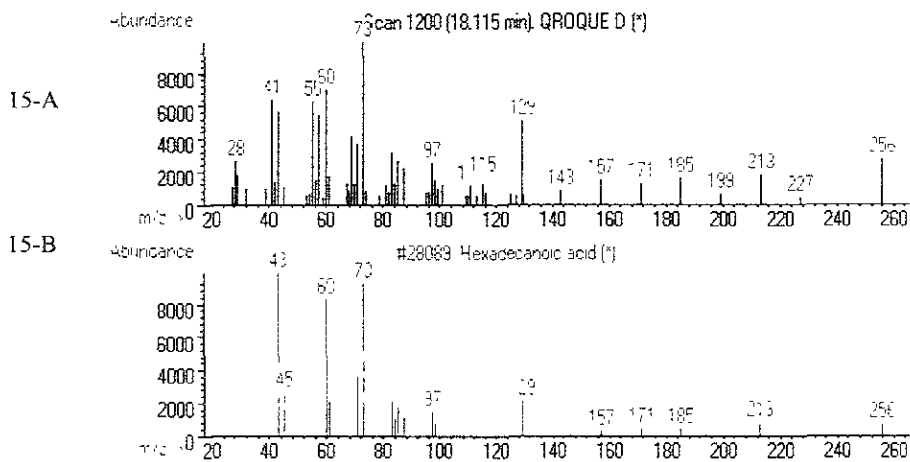


Figura 15 . Espectro de masas del ácido hexadecanoico detectado en el queso Roquefort (15-A) comparado con la espectraloteca del equipo (15-B)

### 3.4 Precisión del método

Se analizaron 12 quesos, de los cuales 4 fueron quesos nacionales y 8 importados. Se realizaron 5 análisis para los de producción nacional y 3 para los quesos importados.

En la mayoría de los quesos se identificaron Etanol y los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico y sólo en algunos casos el ácido tetradecanoico.

La Tabla 6 muestra la respuesta cromatográfica en unidades de área ésta se construyó con el promedio de las áreas obtenidas en los diferentes análisis. ND indica que el equipo no logró detectar dicho compuesto. muestra la respuesta obtenida para cada uno de los quesos, también se muestra en la tabla la desviación estándar para cada uno de los valores de área.

Tabla 6. Respuesta cromatográfica (Unidades de área) para cada ácido graso libre presente en los quesos y su desviación estándar.

Tipo de queso	Ácido Butírico		Ácido Hexanoico		Ácido Octanoico		Ácido Decanoico		Ácido Dodecanoico		Ácido Tetradecanoico	
	Unidades	DE	Unidades	DE	Unidades	DE	Unidades	DE	Unidades	DE	Unidades	DE
Oaxaca	ND	ND	0.56	0.12	5.17	0.32	7.97	0.25	1.98	0.19	ND	ND
Chihuahua	ND	ND	1.3	0.35	4.46	0.47	9.32	1.12	2.7	0.42	ND	ND
Manchego	0.85	NC	1.54	0.21	4.36	0.69	6.6	0.93	2.06	0.33	ND	ND
Parmesano	6.72	1.85	9.32	4.16	12.53	4.79	21.6	8.49	9.75	1.85	ND	ND
Cheddar	2.06	1.95	1.43	0.28	2.07	0.09	3.9	0.58	1.46	0.09	ND	ND
Gouda	2.1	0.58	2.21	0.31	2.85	0.28	7.68	0.73	3.6	0.25	ND	ND
Edam	2.53	0.38	3.46	0.33	3.91	0.47	10.33	0.68	6.18	0.51	ND	ND
Manchego E.	105.85	13.6	147.1	30.9	181.97	38.66	275.63	51.29	30.53	4.01	10.17	0.45
Brie	28.58	NC	33.61	25.15	25.26	3.71	33.88	3.95	8.75	0.98	ND	ND
Feta	391.13	23.03	414.44	15.79	138.4	1.21	177.74	4.74	40.2	1.1	6.43	NC
Roquefort	249.02	20.24	251.35	6.23	163.26	3.52	226.28	13.55	69.65	12.35	50.82	11.48

DE. Desviación estándar.

ND. No detectado en el CG.

NC. Valor no calculado

Se calcularon los coeficientes de variación obtenidos mediante el valor de la media y la desviación estándar en cada ácido graso presente en los quesos utilizando la siguiente fórmula:

$$\% CV = (\text{Desviación estándar} \times 100) / \text{Media}$$

En el caso del análisis de los quesos se presenta otra posible fuente de variación en los resultados, ya que la matriz es heterogénea en su composición. Para ello se analizó la repetitividad en los resultados de los análisis de cada uno de los quesos estudiados, obteniendo el porcentaje de coeficiente de variación de cada uno de los ácidos grasos en los quesos.

La Tabla 7 muestra los coeficientes de variación obtenidos del análisis de 5 muestras de quesos nacionales y 3 muestras de quesos importados.

Tabla 7. Coeficientes de variación de las muestras analizadas.

Queso	Ácido graso					
	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>12</sub>
Oaxaca	N.C.	7.43	6.24	3.2	10.16	N P
Chihuahua	N.C.	27.18	10.59	11.92	15.61	N P
Tipo Manchego	N.C.	13.86	15.81	14.07	16.35	N P
Parmesano*	*27.63	*44.68	*38.23	*39.29	*18.84	N C
Cheddar	N. C.	19.56	4.34	14.94	6.68	N P
Gouda	27.57	14.32	9.87	9.62	7.21	N. P
Edam	15.19	9.8	12.27	6.63	8.32	N P
Brie	N.C.	N. C.	14.72	11.65	11.26	N P
Feta	5.89	3.81	0.88	2.67	2.76	N P
Roquefort	8.13	2.48	2.16	5.99	17.74	22.69
Manchego Esp.	12.85	12.01	21.25	18.61	13.16	4.51

\* Valores omitidos en el análisis de resultados

N.C No calculado

N.P No presente

Para poder analizar los datos obtenidos de una manera general, se omitieron los resultados del queso Parmesano por ser el que varía más con respecto a todos los demás resultados. Este se analizó aparte.

Los demás quesos presentan el siguiente comportamiento en la variación de cada uno sus análisis:

El queso que presenta el mayor porcentaje de variación es el queso Gouda, ya que su coeficiente de variación oscila entre 7.21 y 27.5%, seguido del queso Chihuahua con valores entre 10 y 27.1. Con valores más bajos de porcentaje de variación se encuentran el queso Roquefort, Manchego Español, Cheddar, tipo Manchego y Edam.

Finalmente, los quesos con menor variación en sus ácidos grasos son los quesos Feta y Oaxaca, con valores de porcentaje de variación de 0.88 a 5.89% y 3.2 a 10.16% respectivamente. Cabe señalar que el queso Feta y el queso Oaxaca son quesos frescos, éste último con un sabor y aroma suave, mientras que el queso Feta tiene un sabor y aroma muy fuerte. Estos quesos no tienen un período de maduración propiamente dicho, y esto puede ser la razón de no tener valores muy altos de variación en sus análisis, ya que son más homogéneos en su composición.

Analizando los coeficientes de variación de cada ácido graso, encontramos que el que tiene mayor variabilidad es el ácido butanoico, seguido del hexanoico, octanoico, decanoico y finalmente el dodecanoico. El tener mayor variabilidad conforme el ácido graso es más volátil puede deberse a que cuando un ácido graso tiene una mayor volatilidad, es más susceptible a desorberse de la fibra cuando ésta es transferida del frasco con muestra al CG, perdiéndose así una pequeña cantidad del compuesto. aún estando la fibra cubierta por la aguja de la jeringa. Esto provoca que la variabilidad sea mayor, afectando en este caso las condiciones y la velocidad de transferencia de la jeringa al CG. Estos factores afectan en menor proporción a los ácidos grasos de cadena mas larga por ser menos volátiles. Esto se ve reflejado en los datos, pues muestran cómo es que entre más volátil es el ácido graso, mayor es la variación del mismo.

Después de analizar los quesos se realizaron 11 análisis por MEFS-CGC de una mezcla estándar bajo las condiciones descritas en el inciso 2.9. Esto se realizó con el objetivo de mostrar la

precisión del método. A partir de los resultados obtenidos en este experimento, se calcularon los coeficientes de variación para cada uno de los ácidos grasos de la mezcla estándar.

Tabla 8. Coeficientes de variación de estándares.

Análisis	Unidades de área					
	Butanoico	Hexanoico	Heptanoico	Octanoico	Nonanoico	Dodecanoico
1	116.57	21.51	35.09	186.30	156.34	28.51
2	123.16	23.67	35.66	176.39	150.02	22.12
3	111.78	20.87	33.30	173.32	139.84	24.07
4	112.60	18.24	29.81	146.77	112.21	*
5	114.81	22.59	29.54	141.64	111.81	*
6	111.97	18.04	30.39	160.58	136.21	23.99
7	117.13	19.87	31.99	162.40	133.98	20.33
8	134.21	22.36	34.97	178.58	145.11	24.69
9	124.80	21.05	34.27	176.63	146.12	27.15
10	127.37	21.40	33.44	175.97	144.98	21.11
11	147.97	21.17	33.72	173.84	145.93	22.70
<b>Coefficiente de Variación (%)</b>	<b>8.76</b>	<b>7.82</b>	<b>6.32</b>	<b>7.90</b>	<b>9.93</b>	<b>10.60</b>

\* No detectado.

De la Tabla 8 podemos observar los coeficientes de variación para cada uno de los ácidos grasos, siendo el ácido dodecanoico el de mayor variación con 10.60% de CV, mientras que el ácido heptanoico es el ácido que presenta el menor coeficiente de variación con 6.32%. Esto muestra que el método por MEFS propuesto presenta una repetitividad aceptable ya que de acuerdo con la literatura un método por MEFS es adecuado si se tiene un valor del orden de 10% o menor(21) y en este caso los datos pueden reproducirse con un valor de coeficiente de variación menor al 11%

Las matrices de alimentos como los quesos, que son muy heterogéneas provocan que los coeficientes de variación sean mayores a los estándares, puesto que los quesos, sobre todo los mas madurados, tienen partes más afectadas por la lipólisis, lo que nos da como resultado una

mayor concentración de ácidos grasos libres en ciertas partes del queso (generalmente la parte externa) y aunque se trató de homogenizar toda la muestra, este es un factor difícil de controlar, lo que se reflejó en los coeficientes de variación, siendo mayores que en los estándares.

Por los resultados obtenidos, podemos decir que la técnica de MEFS-CG es un método que tiene una buena reproducibilidad, aún en el análisis de quesos, ya que los altos valores de % de CV se deben principalmente a que los quesos son muy heterogéneos en su composición de ácidos grasos.

La MEFS ofrece ciertas ventajas en la metodología de extracción de volátiles. A continuación se presenta la Tabla 9, la cual muestra un resumen de las diferentes técnicas de extracción que se han utilizado para analizar compuestos volátiles de quesos, comparando los aspectos más importantes de cada una de las técnicas, así como los resultados obtenidos con cada una de ellas. El cuadro muestra de manera muy clara las diferencias en las metodologías haciendo visibles las ventajas y desventajas en cada una de ellas.

En cuanto a la cantidad de muestra observamos que para la técnica de purga y trampa se requiere muy pequeñas cantidades de muestra (3.5g) mientras que la destilación molecular requiere de una gran cantidad de muestra (2700g) Para el caso de MEFS se requieren 50 a 100g, siendo esta cantidad más representativa de la muestra de queso, sin llegar a ser una cantidad muy grande de muestra. Encontramos que para el tratamiento previo que se debe dar al queso, él mas complicado es el que se hace en la destilación molecular, ya que se requiere hacer incluso una centrifugación, mientras que el tratamiento previo más sencillo es para la técnica de MEFS pues solo requiere de cortar el queso.

Tabla 9 Comparación de 5 técnicas de extracción de compuestos volátiles en queso

Métodos de extracción de volátiles	Destilación Molecular (10)	Destilación y extracción simultaneas (27, 8)	Purga y trampa (11, 28)	Extracción con disolventes (27)	MEFS
Tratamiento de muestra previo de muestra	Se cortan 2700 g de queso y se someten a centrifugación durante 2 horas, obteniendo un aceite.	Se cortan 30 gramos de queso y se agregan 300mL de agua y 50 mL de diclorometano.	Se muelen 5 gramos de queso y 3.5 gramos de $\text{Na}_2\text{SO}_4$ en un mortero.	Se homogenizan 15 gramos de queso con 15 gramos de celita en un mortero.	Se cortan 50 gramos de queso y se colocan en un frasco de vidrio.
Tratamiento de extracción	El aceite obtenido se destila en un equipo de destilación especialmente diseñado con 2 trampas. La fracción orgánica de la extracción se seca con $\text{MgSO}_4$ y se evapora el disolvente con nitrógeno. El extracto obtenido se inyecta en el cromatógrafo.	Se destila y el extracto se concentra mediante un concentrador Kuderna-Danish. Finalmente se seca con vapor de nitrógeno. Una dilución del extracto se inyecta en el cromatógrafo.	Las muestras se colocan en un sistema de purga con gas acarreador helio con trampas de Tenax para atrapar los componentes volátiles, que posteriormente se desorben en el cromatógrafo.	La muestra homogenizada se colocan en una jeringa de 50 mL con papel filtro en los extremos. Se hace pasar acetónitrilo a través de la jeringa hasta coleccionar 5 mL, que serán utilizados para el análisis cromatográfico	El frasco se coloca en baño María a 60°C y se inyecta la fibra de MEFS exponiéndola al vapor sobrenadante.
Tiempo requerido	3 horas aprox.	3 horas aprox	45 minutos aprox.	30 minutos aprox.	1 hora 30 minutos
Equipo necesario	Equipo de centrifuga, equipo para destilación molecular con dos trampas de enfriamiento con nitrógeno. Tanque de nitrógeno para evaporar el disolvente	Equipo de destilación, equipo concentrador Kuderna Danish. Tanque de nitrógeno para evaporar el disolvente.	Equipo de purga y trampa con trampa de Tenax. Gas acarreador helio.	Celita y jeringa utilizada en la extracción.	Fibra para MEFS, baño María
Solventes utilizados	Éter etílico y agua	Diclorometano y agua	Ninguno	Acetonitrilo	Ninguno
Compuestos detectados	25	24	60	29	7
Compuestos identificados	16	19	38	10	7
Ácidos grasos identificados	5	19	1	7	6



En el caso de tratamiento de extracción de muestra notamos que la técnica mas complicada es la destilación molecular y la extracción-destilación simultáneas, ya que en ambos casos se requiere de una destilación, así como la concentración y aislamiento del extracto obtenido, haciendo de estas técnicas muy complicadas. En el caso de la técnica de purga y trampa también requieren tratamiento posterior del extracto. Por otro lado encontramos que la técnica más sencilla es la MEFS, ya que solo requiere de colocar la fibra en el frasco de vidrio colocado en baño María. Esto hace que la MEFS se pueda presentar como la técnica menos laboriosa de las analizadas.

En cuanto al equipo necesario observamos como es que las técnicas utilizadas requieren de altos costos en cuanto a equipo se refiere. Por mencionar un ejemplo, la técnica de purga y trampa requiere del equipo, con trampas de Tenax, utilizando incluso un tanque de helio usado como gas acarreador. Otro ejemplo es la destilación y extracción simultáneas, que requiere un sistema de destilación, un concentrador y un tanque de nitrógeno para evaporar. En el caso de la extracción con disolventes encontramos que es la técnica que requiere del equipo más sencillo, pues solo se necesita de una jeringa y celita para empacar. Aún con ello la MEFS presenta una buena opción ya que solo requiere de la fibra para MEFS, la cual puede ser utilizada para otros análisis. Además de esto último la MEFS muestra otra ventaja, ya que es una técnica que no utiliza disolventes como el caso de destilación molecular, extracción-destilación simultáneas y extracción con disolventes, además la MEFS es una técnica en la cual la muestra no tiene contacto con ningún reactivo como el caso de purga y trampa.

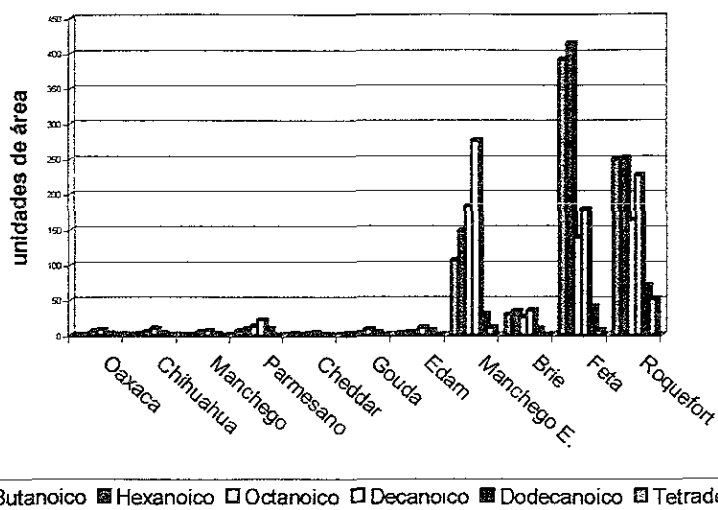
El tiempo de la preparación de muestra y extracción de analitos es un factor importante en cualquier tipo de análisis, en este caso la técnica que presenta el menor tiempo de extracción es la extracción con disolventes (30 minutos), aunque la MEFS presenta un corto tiempo de análisis (1.5 horas) haciendo que este análisis no sea demasiado largo.

Finalmente los resultados arrojados por cada uno de los métodos muestran que la técnica de purga y trampa tiene la mayor sensibilidad, en la cual se han reportado 38 compuestos identificados, aunque de estos solo 1 es un ácido graso, cabe señalar que todos los demás compuestos identificados por esta técnica presentan una volatilidad muy baja. La técnica de destilación-extracción simultáneas, muestra una alta sensibilidad identificando 19 compuestos de los cuales todos son ácidos grasos, incluyendo varios ramificados. La MEFS presenta una relativa baja sensibilidad, ya que solo se identificaron 7 compuestos, aunque de ellos 6 son ácidos grasos, que se han reportado como los principales responsables del aroma en el queso.

En general la MEFS presenta una técnica más sencilla en la mayoría de los aspectos, siendo una técnica de extracción de volátiles que presenta muchas ventajas sobre las demás utilizadas en el análisis de los quesos.

### **3.5 Análisis de la composición de ácidos grasos en diferentes quesos**

La Gráfica 1 muestra de una manera más clara la relación de área del análisis cromatográfico con la cantidad de ácidos graso de cada queso, lográndose visualizar la diferencia de respuesta para los diferentes quesos.



Gráfica 1. Respuesta en unidades de área del cromatograma para cada ácido graso en diferentes quesos.

Como era de esperarse, los quesos más madurados presentan valores muy altos en la respuesta, mientras que los quesos menos fuertes tienen una respuesta muy baja.

Se puede observar los quesos Feta, Roquefort y Manchego Español presentan la mayor respuesta en los cromatogramas, seguida del queso Brie y Parmesano. En esta gráfica es visible la cantidad de ácidos grasos en cada uno de los quesos, lo cual corresponde a la intensidad en el aroma de cada uno de ellos. Los quesos que presentan una alta concentración de ácidos grasos en general, presentan un aroma más intenso.

Para tener un orden de magnitud de la cantidad de ácidos grasos presentes en los quesos, se determinó el porcentaje relativo de los ácidos grasos en los quesos. Para ello se utilizó la normalización de áreas. Por normalización de áreas se entiende como cálculo de la composición porcentual mediante la medición del área de cada pico y la división de cada área por el total.

$$\% A = ( \text{Área de A} / \text{Área total} ) \times 100$$

donde A es un pico en un análisis cromatográfico.

Cuando se analizan los componentes de una serie homóloga con puntos de ebullición muy próximos, este método puede usarse para calcular el porcentaje en peso. Esto supone que todos los picos fueron eluidos y que cada compuesto tiene la misma respuesta en el detector.

Tabla 10. Porcentaje relativo de ácidos grasos en diferentes quesos (Datos experimentales)

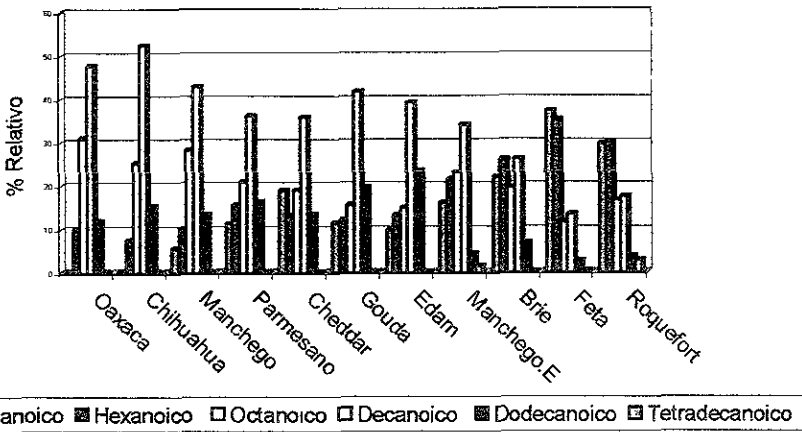
Tipo de queso	Ácido Butanoico C <sub>4</sub>	Ácido Hexanoico C <sub>6</sub>	Ácido Octanoico C <sub>8</sub>	Ácido Decanoico C <sub>10</sub>	Ácido Dodecanoico C <sub>12</sub>	Ácido Tetradecanoico C <sub>14</sub>
Oaxaca	■	9.8	30.8	47.5	11.8	•
Chihuahua	■	7.3	25.0	52.4	15.2	•
Manchego	5.5	10.0	28.3	42.8	13.3	•
Parmesano	11.2	15.5	20.9	36.0	16.3	■
Cheddar	18.9	13.1	18.9	36.7	13.4	•
Gouda	11.4	12.0	15.4	41.6	19.5	•
Edam	9.6	13.1	14.8	39.1	23.4	•
Manchego E.	16.1	21.3	23.0	33.9	4.2	1.4
Brie	21.9	25.8	19.4	26.0	6.7	•
Feta	37.2	35.1	11.5	13.3	2.5	0.4
Roquefort	29.5	30.1	16.5	17.5	3.7	2.7

• Ácido graso no presente.

■ Ácido graso presente en el queso pero no cuantificado.

De acuerdo con los datos obtenidos y presentados en la Tabla 10 se observa que el queso Feta, Roquefort y Brie tienen mayor porcentaje de ácido hexanoico, a diferencia de los demás quesos analizados, los cuales presentan un mayor porcentaje de ácido decanoico. Los quesos Roquefort, Feta y Brie presentan un olor y aroma más fuerte, podemos entonces suponer que el aroma del queso se relaciona directamente con su contenido de ácidos grasos de cadena corta, ya que los quesos que presentan un aroma más fuerte, tienen mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta, que son más volátiles que los de cadena larga y menos abundantes en estos tres quesos.

La Gráfica 2 ilustra claramente que en todos los casos el ácido graso más abundante es el ácido decanoico. Dicho ácido está presente en todos los quesos, incluso en el Roquefort, el Brie y el Feta donde el contenido de este ácido graso es alto aunque no es el más abundante, pero es claro que su perfil de ácidos grasos es diferente al de los demás quesos



Gráfica 2. % Relativo de ácidos grasos en 11 variedades de quesos.

La Tabla 11 presenta la respuesta en el cromatógrafo de gases para el análisis de los quesos Roquefort y Chihuahua, los valores son reportados en unidades de área. La tabla se presenta con la finalidad de comparar dos quesos elaborados en diferentes condiciones, como tiempo de maduración, microorganismo utilizado en su elaboración y tipo de leche.

Tabla 11. Respuesta en unidades de área del queso Roquefort y Chihuahua

Unidades de área		
Ácido graso	Roquefort	Chihuahua
Butanoico	249.02	
Hexanoico	251.35	1 306
Octanoico	163.26	4 463
Decanoico	226.28	9 322
Dodecanoico	69.65	2.703
Tetradecanoico	50.82	ND

ND. Ácido graso no detectado en el CG.

Como era de esperarse, ya que son quesos con diferente tiempo de maduración, el queso Roquefort presentó una alta concentración de ácidos grasos, principalmente de ácido hexanoico y butanoico, mientras que en el queso Chihuahua la concentración de ácidos grasos es mucho menor y no aparece el ácido tetradecanoico.

Las Figuras 16-A y 16-B muestran los análisis de queso Roquefort y Chihuahua respectivamente.

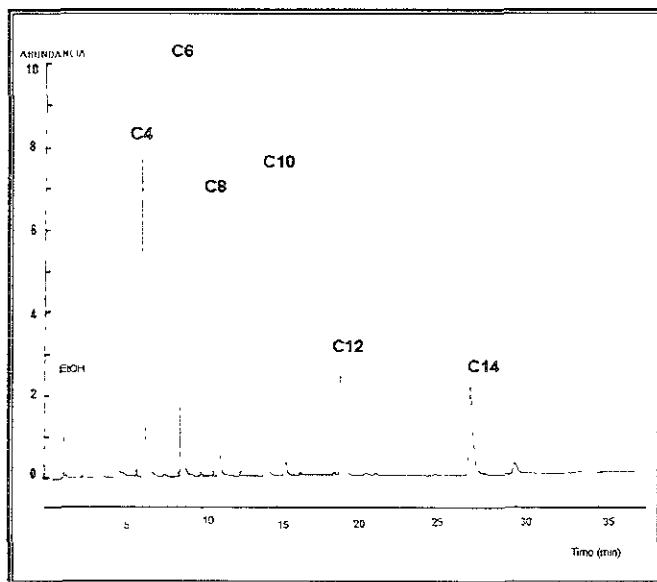


Figura 16-A. Análisis de queso Roquefort por MEFS-CG. Extracción por 90 minutos a 60°C.

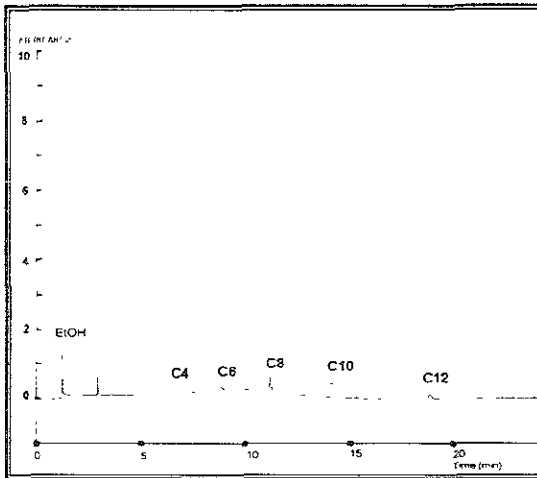
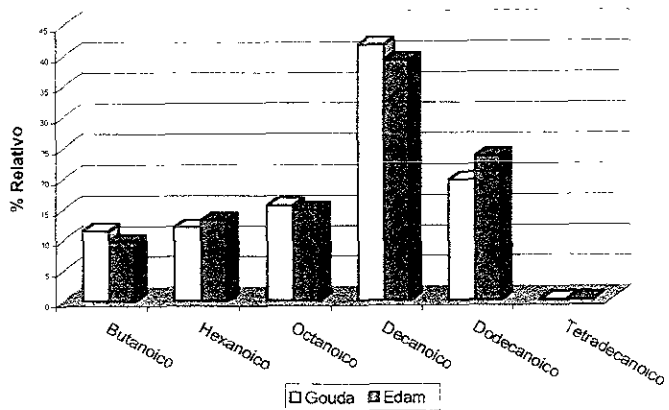


Figura 16-B Análisis de queso Chihuahua por MEFS-CG Extracción por 90 minutos a 60°C

Otro caso interesante es el caso de los quesos Gouda y Edam ya que contrario al caso anterior, estos dos quesos son elaborados en condiciones semejantes, además de ser muy parecidos en el aroma y sabor (Tabla 2. Evaluación sensorial), lo cual se ve reflejado en la Tabla 12 que muestra la respuesta en el cromatógrafo de gases en unidades de área, reflejando la semejanza en la respuesta para el análisis de dichos quesos. Esto también se refleja en la Gráfica 3 que muestra sus porcentajes relativos de ácidos grasos.

Tabla 12. Respuesta en unidades de área del queso Gouda y Edam

Ácido graso	Unidades de área	
	Gouda	Edam
Butanoico	2 103	2 563
Hexanoico	2 216	3 466
Octanoico	2 853	3 91
Decanoico	7 683	10 333
Dodecanoico	3 606	6 186



Gráfica 3. % Relativo de ácidos grasos en queso Gouda y Edam

Las Figuras 17-A y 17-B que muestran los cromatogramas de dichos quesos.

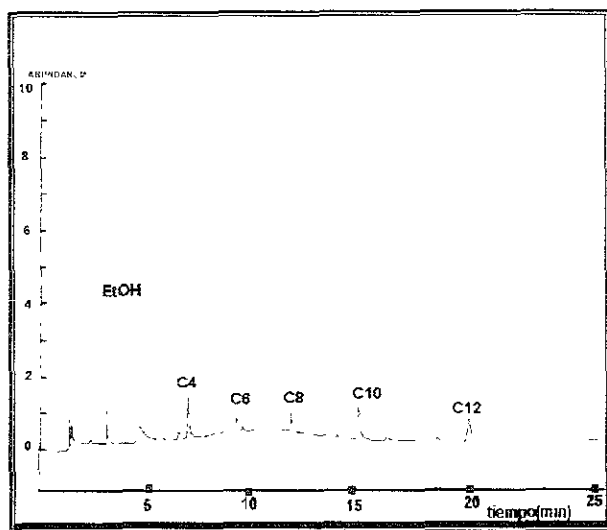


Figura 17-A. Análisis de queso Edam por MEFS-CG. Extracción durante 90 minutos a 60°C



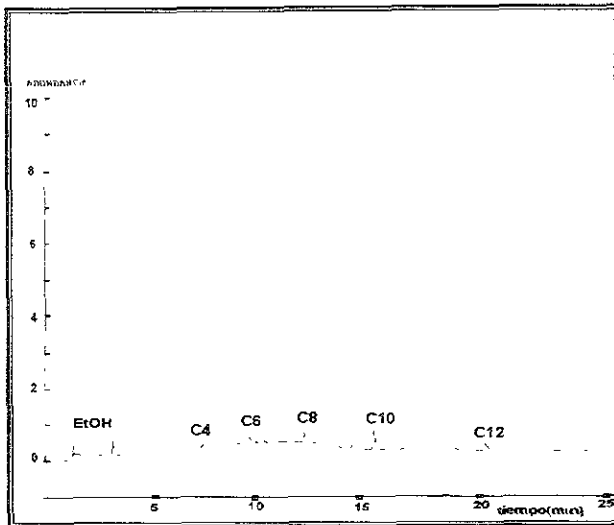


Figura 17-B. Análisis de queso Gouda por MEFS-CG. Extracción durante 90 minutos a 60°C.

Las Figuras 18-A y 18-B muestran los análisis de queso Manchego español y tipo Manchego nacional respectivamente. El queso español tiene un tiempo de maduración (3 meses) mucho más largo que el queso nacional (15 días). Como se puede observar en los cromatogramas, la maduración es un proceso que aumenta la concentración de ácidos grasos en los quesos, lo cual se refleja en el aroma y sabor haciéndolos más fuertes.

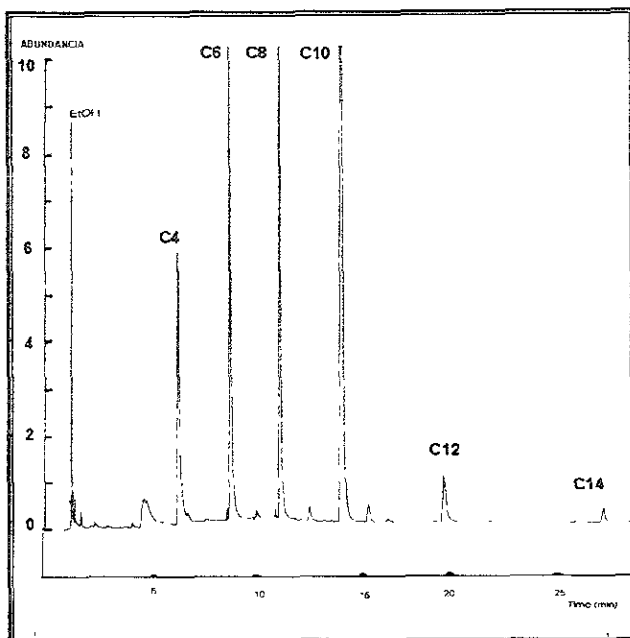


Figura 18-A. Análisis de queso Manchego español por MEFS-CG. Extracción por 90 minutos a 60°C.

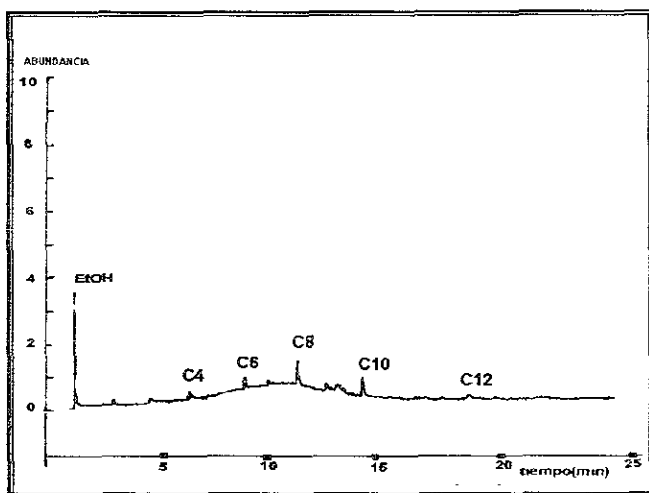
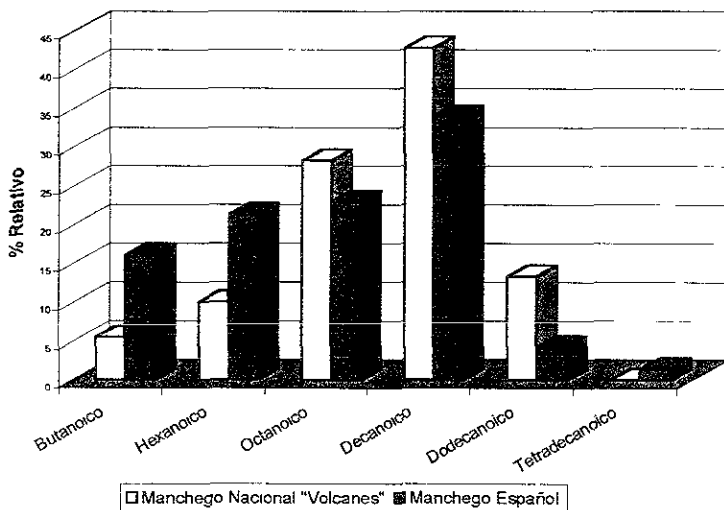


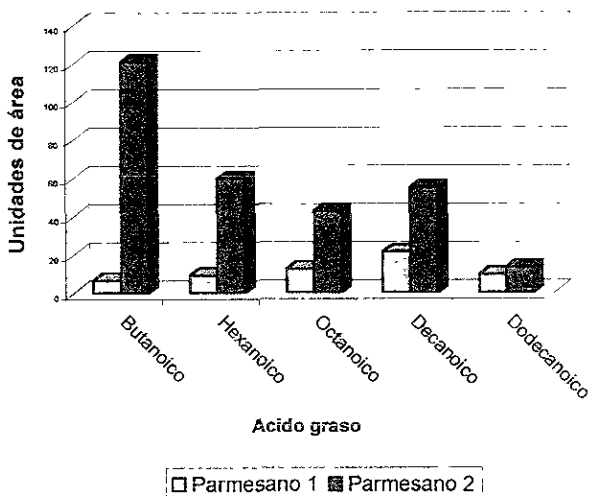
Figura 18-B. Análisis de queso tipo Manchego nacional por MEFS-CG. Extracción por 90 minutos a 60°C.

La Gráfica 4 muestra el porcentaje de ácidos grasos en estos dos quesos, observándose que cuando el tiempo de maduración es mayor, el porcentaje de ácidos grasos de cadena corta (butanoico y hexanoico) es mayor para el queso Manchego español con respecto al queso nacional que presenta un bajo porcentaje de dichos ácidos, mientras que los ácidos grasos de cadena mas larga (octanoico y decanoico) se presentan en mayor porcentaje en el queso nacional con respecto al queso español, esto puede ser otra razón por la cual aumentan la intensidad en el sabor y el aroma en los quesos madurados por largos periodos, aunándose al hecho de que durante la maduración se están liberando ácidos grasos que producen el aroma fuerte y característico. Otro aspecto que puede influir en la fuerza del aroma en este queso es que está elaborado a partir de leche de oveja, pudiendo esto conferirle parte de la fuerza en su aroma.



Gráfica 4. Porcentaje relativo de ácidos grasos en quesos tipo Manchego nacional y español

La Gráfica 5 muestra la respuesta del análisis cromatográfico para una muestra de queso Parmesano (BEL-PAESE) comprada en el supermercado pero una parte del queso fue analizado inmediatamente (Parmesano 1) y otra parte fue almacenada en refrigeración durante 6 semanas (Parmesano 2), para ser analizada posteriormente.

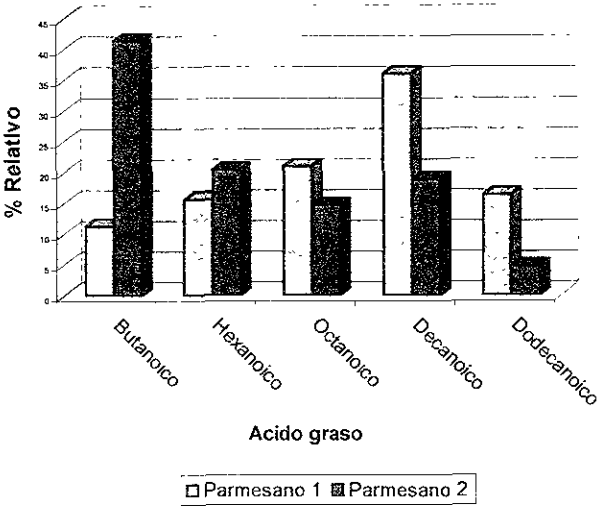


Gráfica 5 Respuesta en unidades de área para Queso Parmesano 1 y Parmesano 2

Como se puede observar, la muestra de queso Parmesano 2 presenta una respuesta mucho mayor. Esto era de esperarse, ya que al tener más tiempo de maduración, el proceso de lipólisis continúa, generándose una mayor cantidad de ácidos grasos libres. Esta gráfica muestra que los ácidos grasos de cadena corta aumentan más que los ácidos de cadena larga.

En este caso, el queso Parmesano 2 era más duro y más seco, además de tener un aroma más intenso y picante. Esto último puede deberse a la influencia de los ácidos grasos de cadena corta que están en mayor proporción que los de cadena larga, esto puede observarse en la Gráfica 6. Se

puede observar también como es que el ácido hexanoico y principalmente el butanoico aumentan considerablemente su porcentaje.



Gráfica 6. Porcentaje relativo de ácidos grasos en queso Parmesano Normal y Refrigerado por un mes.

### 3.6 Efecto de la polaridad de la fibra

Se realizó el análisis de los quesos Feta, Roquefort y Manchego Español con una fibra de PDMS-DVB, esta fibra es una mezcla de dos materiales (Polidimetilsiloxano y divinilbenceno), los cuales tienen características no polares y polares respectivamente. Esta fibra es considerada como semipolar. Debido a la naturaleza polar de los ácidos grasos, se esperaba una menor extracción de estos compuestos. Sin embargo se pensaba que se podrían adsorber otros compuestos que no fueran polares y que contribuyeran al aroma.

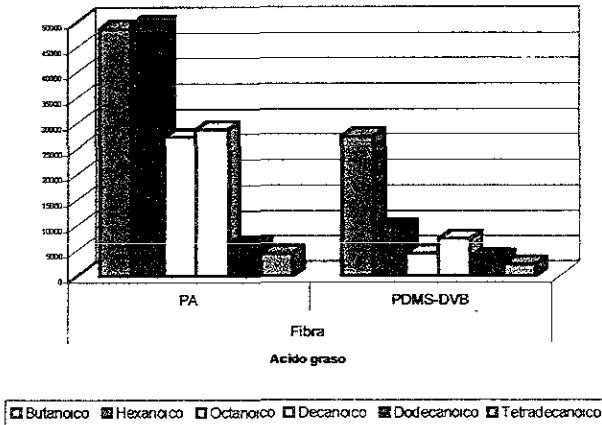
La Tabla 13 muestra la comparación de la respuesta del análisis del queso Manchego Español, por MEFS-CG, usando una fibra de PA y una fibra de PDMS-DVB respectivamente.

Tabla 13. Respuesta en unidades de área para el análisis de queso Manchego Español con fibra PA y PDMS-DVB respectivamente.

Unidades de área		
Ácido graso	PA	PDMS-DVB
Butanoico	105.85	13.82
Hexanoico	147.1	12.75
Octanoico	181.97	12.15
Decanoico	275.63	14.75
Dodecanoico	30.53	13.11
Tetradecanoico	10.17	ND

ND. Ácido graso no detectado.

Como se observa el análisis con la fibra de PA presenta una extracción mas eficiente que con la fibra de PDMS-DVB extrayéndose también el ácido tetradecanoico, mientras que la poca selectividad de la fibra PDMS-DVB para estos compuestos, hace que la eficiencia de la extracción sea baja. Esto era de esperarse, ya que es una fibra semipolar. La Gráfica 7 muestra estos resultados en forma mas clara.



Gráfica 7. Respuesta en Unidades de área del análisis de queso Roquefort con fibra de PA y de PDMS-DVB

Se puede observar que la extracción más eficiente se llevó a cabo con la fibra de PA. Esto es debido a que la respuesta en el CG es mucho mayor cuando se realiza el análisis con la fibra PA.

Por otro lado en el análisis con la fibra PDMS-DVB la extracción del ácido butanoico fue mayor que todos los demás ácidos grasos.

Las Figuras 19-A y 19-B muestran el cromatograma obtenido en el análisis de este queso con la fibra PA y PDMS-DVB

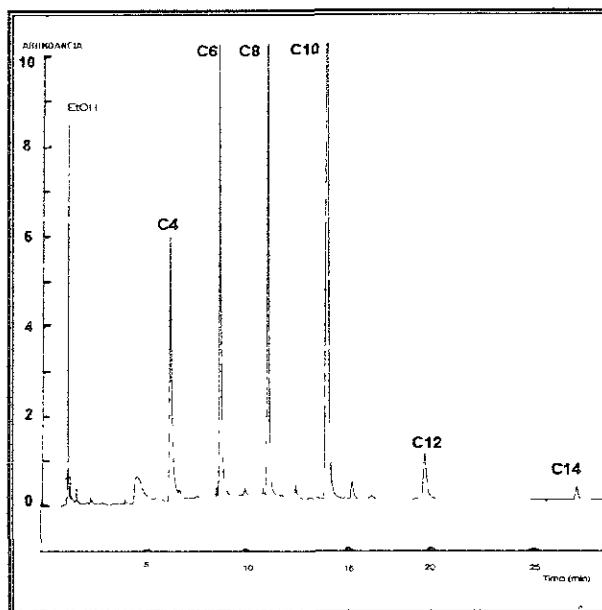


Figura 19-A. Análisis de queso Manchego español por MEFS-CG con fibra PA. Extracción por 90 minutos a 60°C.

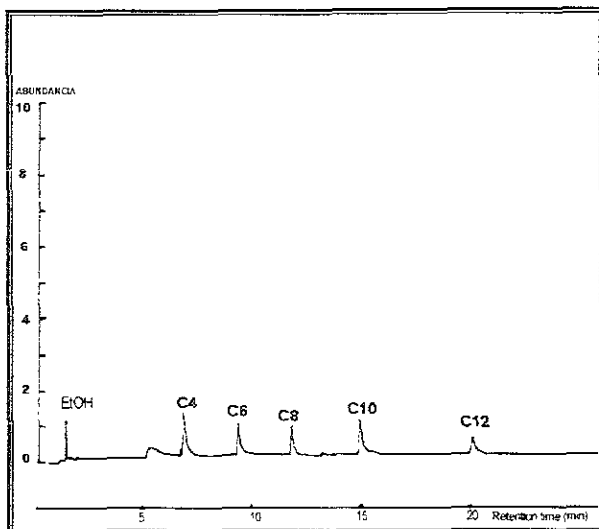


Figura 19-B. Análisis de queso Manchego español por MEFS-CG con fibra PDMS-DVB. Extracción por 90 minutos a 60°C

Considerando estos resultados se puede proponer que la extracción de los ácidos grasos es más eficiente utilizando una fibra polar (PA) que utilizando una fibra semipolar (PDMS-DVB).

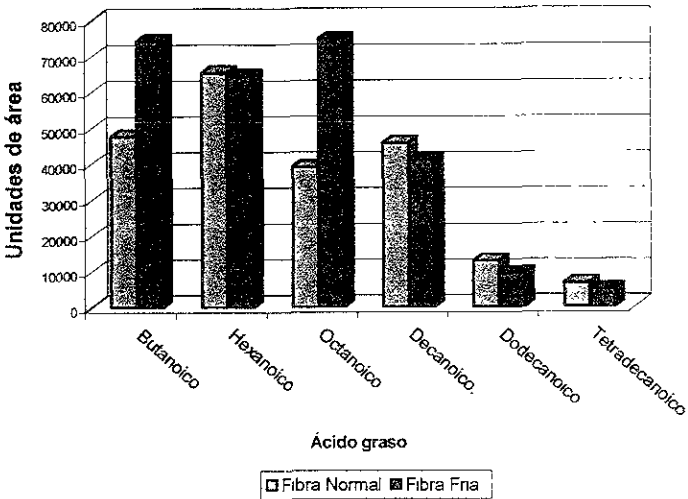
### 3.7 Análisis con enfriamiento de la fibra

Otro factor que puede afectar la extracción de los analitos es la temperatura de la fibra, por lo que se realizaron algunos experimentos con la fibra normal y otros enfriando la fibra, ya que en la literatura (20) se han reportado mejores resultados de extracción cuando se enfría la fibra. Por ello se han diseñado un sistema de enfriamiento de la fibra mediante la inyección de CO<sub>2</sub> a la fibra durante la extracción. Sin embargo este diseño no se encuentra disponible comercialmente, por esta razón el experimento se realizó enfriando previamente la fibra en un refrigerador durante 30 minutos antes de hacer la extracción.



Se obtuvieron los datos de la respuesta del cromatógrafo en unidades de área del análisis de queso Roquefort con las condiciones descritas.

La Gráfica 8 muestra la respuesta cromatográfica del análisis del queso Roquefort mediante MEFS-CG con la fibra en condiciones de uso normal y la fibra fría antes de la extracción. Con ello se busca que la fibra esté lo más fría posible durante el análisis de volátiles del queso.



Gráfica 8. Respuesta del cromatógrafo en unidades de área del análisis de queso Roquefort por MEFS-CGC usando la fibra en condiciones normales y la fibra fría.

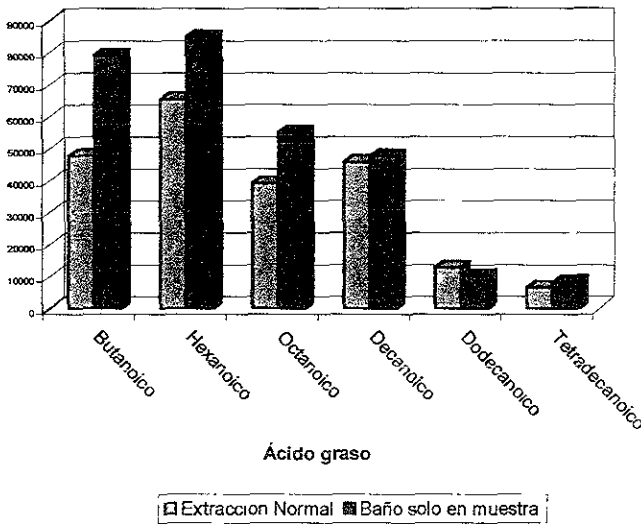
Se puede observar que mediante el uso de la fibra fría se obtiene una mayor extracción de los ácidos butanoico y octanoico, mientras que los demás ácidos grasos se extraen en concentraciones muy semejantes que las encontradas en el procedimiento normal. Con esto se puede ver que el enfriamiento de la fibra afecta sólo la extracción de los ácidos grasos de cadena mas corta ( $C_4$  y  $C_8$ ) favoreciéndose su extracción por el enfriamiento de la fibra. Mientras que para los demás ácidos grasos, dicho enfriamiento no afecta la eficiencia de la extracción.

### 3.8 Análisis con diferentes condiciones en el baño de agua durante la extracción.

Otro de los factores que puede afectar la Microextracción en Fase Sólida es la forma de extracción, es decir, si la muestra se mantiene a una temperatura determinada durante la extracción (como ya se describió en 2.7) o que sólo parte de la muestra se caliente.

Para hacer una variante de la extracción, tratando de mantener la fibra lo menos caliente posible durante la extracción, se realizó el análisis del queso Roquefort, pero en este caso, sólo se colocó la parte del frasco que contiene la muestra en baño María para evitar en lo posible que la fibra aumentara la temperatura.

La Gráfica 9 muestra la respuesta en unidades de área, del análisis del queso Roquefort por MEFS-CG con las condiciones descritas anteriormente en 2.7



Gráfica 9 Unidades de área para el análisis del queso Roquefort por MEFS-CGC con extracción normal y con baño María solo en la parte inferior del frasco.

Como muestra la gráfica, la extracción más eficiente se obtuvo cuando se colocó el baño María en la parte inferior del frasco (cubriendo la muestra) dejando la fase vapor sin baño, lo que debe

evitar que la fibra se caliente. Así ocurrió para cada uno de los ácidos grasos del queso Roquefort, exceptuando al ácido dodecanoico, el cual no se extrajo en mayor proporción (aunque no por gran diferencia) mediante el procedimiento normal.

Por lo tanto, se encuentra que probablemente mediante esta variante al procedimiento se puede realizar una extracción más eficiente incrementándose la extracción de ácidos grasos de cadena corta sin afectar la proporción de éstos en su análisis.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO QUÍMICO DE MÉXICO

## CONCLUSIONES.

1. En el presente trabajo se propone una metodología para el análisis de los componentes volátiles de los quesos denominada Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases Capilar (MEFS). Se demostraron las siguientes ventajas:

- No requiere de manipulación de la muestra ni durante la preparación de la muestra ni durante la extracción.
- No requiere el uso de disolventes.
- No requiere equipos de altos costos o muy complejos.
- Requiere de un corto tiempo de análisis.
- Presenta una repetitividad aceptable (menor al 10%) en matrices acuosas y aún en matrices tan complejas como el queso.

2. Los resultados del presente trabajo permiten emitir las siguientes recomendaciones para el análisis de los compuesto volátiles de los quesos por MEFS-CG:

- Utilizar una fibra polar como PA, ya que los compuestos a extraer son polares y se obtiene una mayor eficiencia.
- Emplear baño maría solo en la parte del frasco que contiene la muestra.

3. Los análisis llevados a cabo con esta metodología en diferentes tipos de quesos permiten afirmar.

- El ácido decanoico es el ácido graso con mayor porcentaje en la mayoría de los quesos analizados.
- Los quesos elaborados en condiciones similares y que muestran un sabor y aroma semejante, presentan un perfil y un porcentaje de ácidos grasos de cadena corta muy similar.
- Los quesos que presentan una aroma fuerte contienen un mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena corta, mientras que los quesos con aroma débil contienen un mayor porcentaje de ácidos de cadena más larga.
- Los quesos analizados que habían sufrido un proceso de maduración presentaron una mayor concentración de los ácidos grasos conforme aumenta el tiempo de maduración.
- Los quesos elaborados a partir de leche de oveja presentan un porcentaje más alto de ácidos grasos libres y por consiguiente un aroma más fuerte.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Trejo Delambre, B. Cuadernos de Nutrición. 4 (3) 28-34. 1986.
2. Norma Oficial Mexicana. NOM-121-SSA1-1994. Quesos frescos, madurados y procesados. Subsecretaría de regulación y fomento sanitario.
3. Resendiz, J.J. y Roa, A. "Aspectos técnicos y fisicoquímicos en la elaboración de quesos" Trabajo monográfico de actualización. Facultad de Química. UNAM. 1990.
4. Kuang Cow, Ch. "Fatty acids in foods and their implications in the health" Editorial Board. University of Kentucky, USA. 1992.
5. Scot, R. "Fabricación de queso". Editorial Acribia. 2ª Edición. Zaragoza España. p 272-275.
6. Nevarez, L.A. "Determinación de triglicéridos en los principales quesos mexicanos por Cromatografía de gases capilar a alta temperatura (CGC-AT). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 1998.
7. Anzaldúa-Morales, A. "La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica" Editorial Acribia. Zaragoza España, 1994.
8. Lindsay, R.C. Ha, J.K. *J. Food. Sci.* 56(5): 1241-1247, 1994.
9. Elliot, J.M. Haan, B. Parkin, K.L. *J. Dairy. Sci.* 72: 2478-2482, 1989.
10. Christensen, K.R. Reineccius, G.A. *J. Food. Sci.* 60(2):218-220, 1995.
11. Arora, G. Cermier, F. Lee, B. *J. Agric. Food. Chem.* 43: 748-752, 1995.
12. Baldwin, R.E. Cloninger, M.R. *J Food Sci.* 38(3): 528-531, 1994.
13. Dunn, H.C. Lindsay, R.C. *J. Dairy. Sci.* 68: 28559-2864, 1985
14. Barbieri, G. Bolzoni, L. Careri, M. *J Agric. Food Chem.* 42: 1170-1176, 1994.

15. Grob, K.Zucher, F.J. *J Chromatogr* 117: 285, 1976.
16. Hawthorne , S. *Anal. Chem* 64: 633A-642A, 1990.
17. Pratt, K.F. Pawliszin, J. *Anal. Chem.* 64:2101-2110, 1992.
18. Kraut-Vass, A. Thoma, J. *J. Chromatogr* 538: 233-240, 1991.
19. Zhang, Z. Yang, M.J. Pawliszin, J. *Anal. Chem.* 66(17): 844-853. 1994.
20. Lin, P. Adams, M. *Anal. Chem* 67(23): 4396-4404, 1995.
21. Pawliszin, J. "Applications of solid phase Microextraction" .RSC. Chromatography Monographs. Ontario, Canada. 1999.
22. Pawliszin, J. "Solid phase Microextraction. Theory and Practice". Wiley-VCH. Ontario, Canada. 1997.
23. Hawthorne, S. Miller, D. Pawliszin, J Arthur, C. *J Chromatogr* 603: 185-191, 1992.
24. Boyd-Boland, a. Chai, M. Pawliszin, J. Zhang, Z. *J. Environ. Sci Technol.* 28(13): 569-574, 1994.
25. Hamilton, R.J. Hamilton, S. "Lipid analysis. A practical Approach" IRL Press. Liverpool, England. 1992.
26. Chin, H. W. Bernhard, R.A. Rosenberg, M. *J Food. Sci* 61(6). 1118-1122, 1986.
27. Ashima, T. Nakai, S. *J Food Sci* 52(4): 939-942, 1993.
28. Vandeweghe, P. Reineccius. G.A. *J Agric Food Chem* 38:1549-152, 1990.
29. Collin, S. Osman, M. Delcambre, S. Dufour, J.P. *J Agric Food Chem.* 41: 1659-1663. 1993.