



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE COMPONENTES VOLÁTILES Y
SEMIVOLÁTILES DE DIFERENTES VARIEDADES
DE FRESA UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA SEGUIDA DE CROMATOGRAFÍA DE
GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

HUGO MIGUEL TENORIO ROSALES



MÉXICO, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

Presidente: HERMILO LEAL LARA
Vocal: MARCO ANTONIO LEÓN FÉLIX
Secretario: ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ
1^{er} Suplente: MARÍA DE LOURDES OSNAYA SUÁREZ
2^o Suplente: ERNESTO SÁNCHEZ MENDOZA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 101 del Departamento de Química Analítica. División de Estudios de
Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Rocío del Carmen Juárez Ciprés _____

SUSTENTANTE:

Hugo Miguel Tenorio Rosales _____

DEDICATORIA

Dedico esta Tesis a toda mi familia.

Para mis padres Hugo Tenorio y M^a Guillermina Rosales, por su comprensión y ayuda en momentos malos y menos malos. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia, mi empeño y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio.

Gracias por todo lo que me han dado, su amor y sacrificio nunca será en vano, estaré agradecido con ustedes toda la vida. Sin su apoyo no habría sido posible lograr esta meta.

A mis hermanas Jimena y Mariana por su apoyo y paciencia en todos estos años.

AGRADECIMIENTOS

Primero y como más importante me gustaría agradecer sinceramente a mi directora y tutora de Tesis, la Dra. Araceli Peña, su esfuerzo, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación. Gracias por todo el apoyo brindado y la dedicación que me mostró para la realización de esta tesis

También quiero agradecer todo el apoyo recibido por la M en c Rocío Juárez del Carmen por toda la buena disposición que siempre tuvo conmigo en mis múltiples necesidades. Gracias por estar ahí en el laboratorio siempre que la necesitaba.

A todos mis compañeros de laboratorio Alejandra, Miguel, Ana, Luis, Jorge, Sandra, Polo, por compartir sus conocimientos y su amistad durante el trabajo en el laboratorio.

Para aquellos amigos que han compartido conmigo los “ires y venires” en el plano personal durante mi estancia en la Facultad de Química Karla, Carlos, Leonel, Guadalupe, Yeimi, Liliana, Benjamín y Janete con los que compartí muchas actividades extras y de quienes siempre recibí palabras de aliento.

A la UNAM y a la Facultad de Química por brindarme los medios necesarios para lograr una de las metas más importantes en mi vida y ser testigo de mi crecimiento.

Al Lic. Juan Carlos A Embriz tener confianza en mí y darme la oportunidad de dedicarme a lo que más me gusta que es la química.

Y por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo esta dura empresa. A mis padres Hugo Tenorio Juárez y M^a Guillermina Rosales por apoyarme en todo cuanto hacia falta para que estuviera tranquilo y con ánimos de seguir adelante.

ÍNDICE

	Paginas
RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 ANTECEDENTES.....	5
2.1 La Fresa.....	5
2.1.2 Botánica.....	6
2.1.3 Estructura de la planta.....	7
2.2 Composición química de la fresa.....	9
2.3 Transformaciones durante la maduración.....	11
2.3.1 Respiración.....	11
2.3.2 Producción de etileno.....	11
2.3.3 Pérdida de peso.....	12
2.4 Conservadores químicos.....	13
2.5 Sabor y aroma.....	13
2.6 Identificación de compuestos volátiles.....	14
2.7 Microextracción en fase sólida.....	15
2.7.1 Proceso de extracción.....	15
2.7.2 Fibras para la MEFS.....	16
2.7.3 Tipos de extracción.....	19
2.7.4 Selección del modo de extracción.....	19

2.7.5 Variables que afectan el proceso de MEFS.....	20
2.7.5.1 Agitación de la muestra.....	20
2.7.5.2 Tiempo de extracción.....	22
2.7.5.3 Temperatura de extracción.....	23
2.7.5.4 Adición de sal.....	23
2.7.5.5 Desorción de los analitos.....	24
2.8 Cromatografía de gases.....	24
2.9 Espectrometría de masas.....	27
2.10 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	29
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo general.....	32
3.2 Objetivos particulares.....	32
4 DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
4.1 Materiales y equipo.....	33
4.1.2 Reactivos.....	33
4.1.3 Estándares.....	34
4.1.4 Muestras.....	34
4.1.4.1 Preparación de la muestra.....	35
4.2 Análisis cromatográfico.....	35
4.2.1 Condiciones cromatográficas.....	35
4.2.2 Identificación.....	36
4.2.3 Cuantificación de compuestos.....	36

4.3 Microextracción en fase sólida.....	37
4.3.1 Dispositivo para la MEFS.....	37
4.3.2 Optimización de los parámetros de MEFS.....	38
4.3.2.1 Selección de fibra.....	38
4.3.2.2 Efecto de la agitación.....	39
4.3.2.3 Tiempo de extracción.....	39
4.3.2.4 Temperatura de extracción.....	39
4.3.2.5 Efecto de la adición de sal.....	39
4.4 Adición de desinfectante.....	40
5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	41
5.1 Determinación de las condiciones de trabajo.....	41
5.1.2 Selección de fibra.....	41
5.1.3 Efecto de la agitación.....	43
5.1.4 Tiempo de extracción.....	45
5.1.5 Efecto de la temperatura.....	47
5.1.6 Efecto de la adición de sal.....	49
5.2 Procedimiento seleccionado.....	51
5.3 Identificación de compuestos.....	52
5.4 Adición de desinfectante.....	64
5.5 Análisis cuantitativo.....	67
5.5.1 Linealidad del método.....	68
5.5.2 Límites de detección y cuantificación.....	69
5.5.3 Cuantificación de compuestos mayoritarios.....	70

6 CONCLUSIONES.....	71
7 ANEXO.....	73
8 REFERENCIAS.....	81

RESUMEN

Se desarrollo un método por Microextracción en Fase Sólida-Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (MEFS-CG-EM) con el objetivo de determinar los compuestos volátiles y semivolátiles en diferentes muestras de fresas. Identificándose un total de 77 compuestos volátiles, entre los que destacan ésteres (34) y terpenos (14) como los grupos químicos mayoritarios.

El análisis mostró que el perfil de compuestos volátiles y semivolátiles es diferente para las cuatro muestras de fresa estudiadas ya que solo 14 de los 77 identificados se encontraron en todas las muestras. Destacando el Linalol, Metil éster de ácido butanoico y Metil éster de ácido hexanoico como los componentes volátiles mayoritarios.

La extracción de los analitos se realizo por MEFS utilizando una fibra de Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB), agitación 1400 rpm, extracción a temperatura ambiente durante 60 minutos y adición de 1.07 g de NaCl en un volumen de 3 mL de muestra. La identificación se llevó a cabo con los espectros de masas obtenidos y comparándolos con los de la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (Nacional Institute of Standar and Technology).

Se cuantificaron Linalol, Nerolidol, y Metil éster de ácido hexanoico en las 4 muestras en estudio mediante CG-EM en modo barrido total del espectro (SCAN), mientras que para el Étil éster de ácido hexanoico la determinación se efectuó por monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en ingles).

El método presento una linealidad aceptable en el intervalo de concentración de 10 – 90 y 100 – 500 $\mu\text{g/L}$ para el linalol, 1 – 35 $\mu\text{g/L}$ para el nerolidol, 1 – 9 y 50 – 450 $\mu\text{g/L}$ para el etil éster de ácido hexanoico y 50 – 800 $\mu\text{g/L}$ para el metil éster de ácido hexanoico ya que

se obtuvieron coeficientes de correlación (r) mayores a 0.99 y un CV < 10 % para todos los compuestos cuantificados; reflejando una buena precisión.

La técnica de MEFS es una técnica analítica eficiente, reproducible, de fácil manejo y que no requiere el uso de disolventes para caracterizar rápidamente los componentes químicos volátiles de las variedades de fresa.

1 INTRODUCCIÓN

Debido a que las fresas poseen un aroma muy agradable, los compuestos volátiles de la fresa han sido objeto de numerosos estudios, llegando a ser reportados más de 360 compuestos como componentes del aroma¹⁻⁴.

La fresa es uno de los frutos más populares en el mundo. Tradicionalmente México es considerado como un importante productor y exportador, y con el fin de mantener su posición en el mercado mundial, existe un interés en mejorar la producción de esta fruta; así como su calidad⁵.

El principal estado productor de fresa es Michoacán, seguido de otras regiones del país, principalmente en Baja California y Guanajuato. Más del 70 por ciento de la producción nacional de fresa tanto fresca como congelada se destinó a la exportación; ubicando a Estados Unidos como el principal destino (año 2009)^{6,7}. Debido a que la fresa mexicana cumple con los estándares de inocuidad y calidad agroalimentaria más exigentes, le ha permitido que estos productos mexicanos lleguen a mercados tan lejanos como Inglaterra, Holanda, Alemania, Francia, Japón, China y Taiwán⁸.

El sabor de las fresas es muy importante ya que se usa en muchos productos manufacturados, es por eso que existe la necesidad de implementar métodos rápidos y confiables para evaluar estas características siendo los métodos analíticos óptimos para tal fin.

En recientes publicaciones ^{9,10} se ha demostrado que el análisis químico de unas pocas muestras de fresa puede contener toda la información requerida para clasificar y reconocer las variedades de interés utilizando la técnica de Microextracción en fase Sólida (MEFS) en su modo de Headspace (HS), seguido de cromatografía de gases (CG).

2 ANTECEDENTES

2.1 Fresa

Las fresas de fruto grueso cultivadas actualmente se han originado relativamente en tiempos recientes (siglo XIX); por su parte, las formas primitivas están adaptadas a muchos climas y se encuentran en la mayor parte de los continentes. El tamaño del fruto de estos cultivos era pequeño en relación con el que alcanzan los frutos de las variedades modernas^{11, 12}.

La especie a la que se refiere en sus escritos los escritores clásicos Virgilio, Plinio y Ovidio, es la *Fragaria vesca*, común europea, o fresa de los bosques, la cual se ha cultivado en un plan extensivo tanto en Francia como en Inglaterra. La forma más popular de esta especie, y que aun se cultiva, es la alpina, que se distingue por tener un periodo largo de fructificación. Es originaria de las laderas orientales en la zona sur de los Alpes. Una segunda forma cultivada por la misma época fue la “Hautbols” (*Fragaria moschata*) distinguida por ser una planta más grande que *F. Vesca* de fuerte olor. En América, los colonos la llevaron a Massachussets designándola posteriormente como *Fragaria virginiana*. Abundando esta a lo largo de toda la costa del este y del noreste de los Estados Unidos de America¹¹.

La *Fragaria chiloensis* es una especie originaria de la Costa del Sur de Chile, de la Cordillera Meridional de los Andes, de la costa Oeste de Norte América y de las montañas de Hawai. Fue llevada a Francia por el capitán Frezier en 1712, desde Chile.

En los jardines europeos se produjo una hibridación natural entre *F.chiloensis* y *F virginiana*. Una de estas hibridaciones naturales es la *Fragaria ananassa* de la que se obtuvo la variedad “Keens seedling” designada así por Michael Keens en Isleworth

Inglaterra en el año de 1806. A su vez, esta origino la Hovey descubierta por Charles M. Hovey en 1838. Desde entonces han aparecido numerosísimas y excelentes variedades y, como es lógico se siguen obteniendo cada año^{11, 12}.

2.1.2 Botánica

Las fresas se clasifican en el reino vegetal dentro de la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, Orden Rosales, Familia Rosaceae, género *Fragaria*. Del género *Fragaria* se conocen alrededor de 20 especies, que varían en cuanto al número de cromosomas, mostrando una importante poliploidia Las especies silvestres más comunes son diploides, exhibiendo dos juegos de siete cromosomas; otras son tetraploides o hexaploides, y los híbridos más resistentes son octoploides y aún decaploides (Tabla1)¹³.

Tabla 1. Especies y su variación en cuanto al número de cromosomas

DIPLOIDES	TETRAPLOIDES	HEXAPLOIDES	OCTAPLOIDES	DECAPLOIDES
<i>Fragaria daltoniana</i>	<i>Fragaria moupinensis</i>	<i>Fragaria moschata</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>	<i>Fragaria x potentilla</i>
<i>Fragaria iinumae</i>	<i>Fragaria orientalis</i>		<i>Fragaria chiloensis</i>	<i>Fragaria x vescana</i>
<i>Fragaria nilgerrenis</i>			<i>Fragaria iturupensis</i>	
<i>Fragaria nipponica</i>			<i>Fragaria virginiana</i>	
<i>Fragaria nubicola</i>				
<i>Fragaria vesca</i>				
<i>Fragaria viridis</i>				
<i>Fragaria vezoensis</i>				

2.1.3 Estructura de la planta

Las raíces son bastante superficiales, sin embargo, varían mucho según su tipo de suelo. De esta forma, en terrenos arenosos, suelen ser numerosísimas y muy finas, de color casi blanco, mientras que en suelos fuertes son escasas, más gruesas y también lógicamente más profundas¹¹.

El tallo es muy corto, en muchos casos casi reducido a un disco. Este disco tiene la facultad de dividirse o ramificarse formando las llamadas “coronas”. A menudo que la planta envejece aumenta su número, pudiendo llegar hasta 8 o 10¹⁴.

Estas coronas dan lugar a las hojas, que son compuestas, generalmente por tres folios. Los pecíolos suelen ser largos y pelosos. Los foliolos son aserrados, o sea, con el borde en forma de dientes de sierra; el color suele ser verde oscuro por el haz y gris por el envés, el cual esta también recubierto con numerosos pelos^{11,15}.

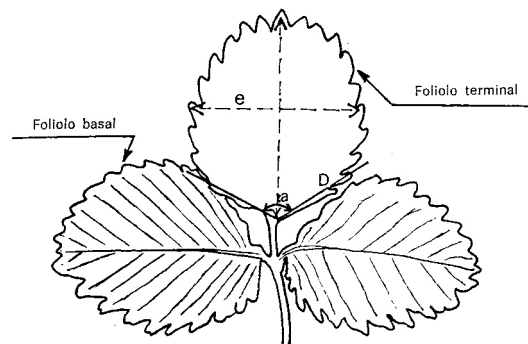


Fig. 4.—Hoja normal de fresa

Figura 1. Hoja normal de fresa¹¹.

De las axilas de las hojas sales unos filamentos que poseen unos nudos; estos nudos son los que dan lugar a los estolones, que en contacto con el suelo emiten raíces, formándose así nuevas plantas. Constituye esta la principal forma de multiplicación hasta el momento¹¹.

De las axilas mencionadas parten también de los pedúnculos florales que posteriormente se ramifican; en el extremo de estos aparecen las flores, que generalmente son de color blanco.

La estructura de la flor se indica en la figura 2.

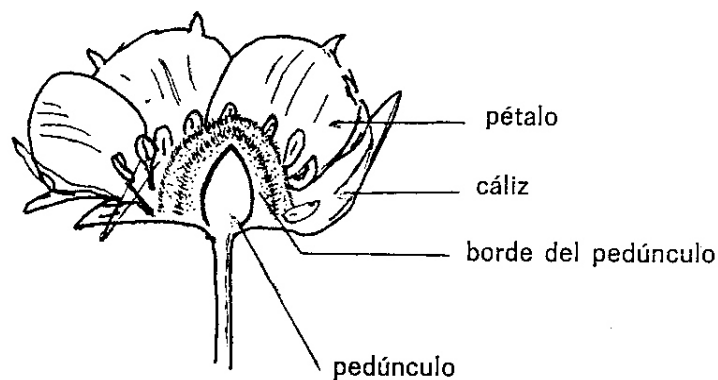


Figura 2. Sección vertical de la flor¹¹.

En la parte superior del pedúnculo hay una gran variedad de pistilos; cada uno de ellos tiene un pistilo y una célula femenina.

Los estambres están colocados alrededor del pedúnculo y contienen el polen en las anteras.

Cuando la antera se rompe, cae el polen que fecunda el ovulo.

El número de pistilos varía según el tamaño de la flor, aunque generalmente oscilan entre 200 y 400, situados en espiral desde la base hasta el extremo. Los estambres, en general, se encuentran en un número que es múltiplo de 5. lo normal es que sean 25, aunque puede que sean 35 o incluso, como ya se ha dicho, que el número no sea múltiplo de 5.

El néctar se segrega desde el pedúnculo y afluye a los lugares en donde se encuentran insertos los filamentos de los estambres.

Como consecuencia de la fecundación aparece la semilla, la cual es necesaria para que los frutos se desarrollen normalmente¹¹.

El fruto del frenal es un eterio (término utilizado en botánica para describir un receptáculo floral engrosado y convertido en fruto) donde el tálamo se desarrolla extraordinariamente durante la maduración y constituye un cuerpo carnoso comestible, de forma cónica, color rojo y sobre el cual se disponen los verdaderos frutos de la planta, pequeños aquenios de color oscuro que en número de entre 150 y 200 se alojan en cada eterio^{13,14}.

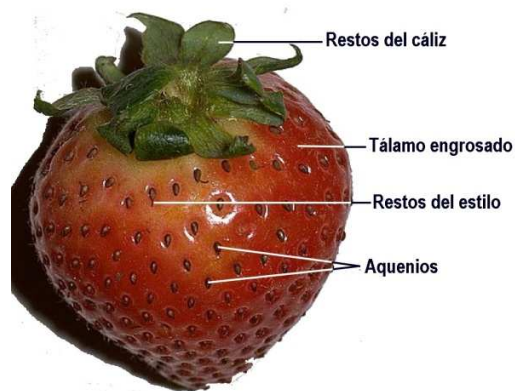


Figura 3. Parte comestible de la planta¹⁶.

2.2 Composición química de la fresa

Actualmente apreciamos la fruta por su delicioso sabor pero las culturas del pasado dotaron a las fresas de un poder místico y curativo y con justificada razón¹². La fresa es un fruto que

aporta pocas calorías y cuyo componente más abundante después del agua son los hidratos de carbono (Tabla 2).

Las fresas pueden ser una excelente fuente de vitaminas E, B6 y sobre todo C (esta última es un componente minoritario en las fresas pero tiene una enorme importancia en la prevención de escorbuto)¹⁷; sustancias de acción antioxidante y un alto contenido de ácidos orgánicos, entre ellos cítrico (de acción desinfectante), málico, oxálico y salicílico (de acción anticoagulante y antiinflamatoria). Otro constituyente importante es el ácido fólico, ya que 200 g de fresa cubren la sexta parte de las necesidades de este ácido. Dada su riqueza en antioxidantes, ácido fólico, potasio y salicilatos, está especialmente recomendada en dietas de prevención de riesgo cardiovascular y de enfermedades degenerativas y cáncer.

Tabla 2. Composición química de la fresa^{11,18}

Agua	80-90%	Tiamina	0.03 mg
Hidratos de carbono	5-10%	Riboflavina	0.03 mg
Proteínas	0.5-0.9%	Niacina	0.6 mg
Lípidos	0.1-0.4%	Hierro	1 mg
Cenizas	1-3%	Sodio	1mg
Valor energético	37 calorías	Potasio	164 mg
Vitamina C	50-90 mg	Calcio	21 mg
Vitamina E	0.20 mg	Fósforo	21 mg
Vitamina B6	0.06 mg		

2.3 Transformaciones durante la maduración

Las fresas se encuentran vivas no solo cuando están unidas a la planta de procedencia; tras su recolección continúan estándolo y siguen desarrollando los procesos metabólicos que operaban mientras se hallaban unidas al vegetal. Una característica importante es el hecho de que respiran, tomando oxígeno y desprendiendo bióxido de carbono y calor, también transpiran; es decir, pierden agua.

Mientras permanecen unidas a la planta, las pérdidas por respiración y transpiración se compensan mediante el flujo de savia que compensa la pérdida de agua y nutrientes. Tras su recolección, las fresas continúan respirando y transpirando, y como han perdido contacto con la fuente de agua y nutrientes, dependen exclusivamente de sus reservas alimenticias y de agua; por tanto, estas pérdidas no se compensan, y se inicia el deterioro¹⁹.

2.3.1 Respiración

Las fresas se caracterizan por una alta tasa de respiración la cual varía dependiendo de la temperatura (Tabla 3).

Tabla 3. Producción de dióxido de carbono a diferentes temperaturas de almacenamiento²⁰.

Temperatura	0 °C	10°C	20°C
mL CO ₂ /Kg.hora	6-10	25-50	50-100

2.3.2 Producción de etileno

Las fresas producen bajas cantidades de etileno (<0,1 µL/kg-h a 20 °C)²¹. Como fruto no climatérico, no responde a la estimulación del etileno (hormona del crecimiento) durante su maduración.

2.3.3 Pérdida de peso

La fresa presenta una elevada tasa de transpiración, produciendo pérdidas de agua que implican arrugamiento (aspecto envejecido), disminución de peso comercial y descenso de la calidad sensorial, afectando a la apariencia, textura y jugosidad del fruto. En la mayoría de los frutos pérdidas del 3-5 % del peso inicial en forma de agua transpirada son suficientes para promover un aspecto arrugado, perdiendo su apariencia externa inicial. Problema todavía más notable en el caso de las fresas, pues debido a su fina piel no poseen una buena barrera exterior con que retener el agua ²¹.

Debido a la maduración, en las fresas ocurren la serie de cambios fisiológicos ya mencionados que afectan la apariencia del fruto, estos cambios tienen que ver con la textura; ya que el fruto pierde firmeza debido a acción de enzimas como lo son la pectinesterasa, poligalacturonasa, pectatoliasas y pectinliasa. Cambios en el color debido a la degradación de carotenoides y xantofilas que dan origen a la aparición de pigmentos rojos llamados antocianinas, los cuales brindan a la fresa el color rojo característico. Los azúcares totales aumentan durante la maduración del fruto, lo que conlleva a cambios en el sabor y aroma; convirtiéndose más dulce a medida que el almidón se convierte en azúcar, y con la producción de compuestos volátiles que generalmente proporcionan el aroma a la fruta^{19, 22-24}.

La vida útil de la fresa puede verse mejorada por el control de procesos de deterioro o inactivación de procesos fisiológicos, tanto del propio fruto como de los patógenos que pueda contener. La temperatura es el factor medio ambiental básico para conservarla durante el almacenamiento, por afectar a su tasa de respiración y/o otras reacciones biológicas.

2.4 Conservadores químicos

Los conservadores son agentes químicos, los cuales funcionan retardando o inhibiendo cambios indeseables en el alimento. Estos cambios pueden ser causados por microorganismos, enzimas propias de los alimentos o reacciones químicas. Aunque inhibir el crecimiento de microorganismos es uno de los principales propósitos²⁵. Estos se dividen en dos grandes grupos, los orgánicos y los inorgánicos. Los conservadores orgánicos se subdividen a su vez en ácidos orgánicos y sus sales, alcoholes y azúcares (cuando la concentración es elevada). Los inorgánicos también incluyen ácido y sus sales, álcalis y sus sales, halógenos, peróxidos, gases y metales pesados²⁶. De este último grupo, la plata tiene un efecto antiséptico o germicida, esta acción es denominada oligodinámica. También es el único metal que se recomienda para usarse en alimentos.

La plata coloidal es coloide formado de pequeñas partículas de plata metálica cargadas eléctricamente en forma de átomos y unidas a proteínas (gernetina o albúmina por ejemplo). La plata coloidal es un poderoso destructor de gérmenes cada vez mas popular en todo el mundo,; su acción consiste en inhibir las enzimas implicadas en el proceso respiratorio de óxido-reducción celular de las bacterias, provocando su muerte en pocos minutos²⁸.

2.5 Sabor y aroma

El sabor puede ser considerado como una serie de componentes volátiles que son captados por la nariz (aroma) y componentes no volátiles que son percibidos por la lengua (gusto)

junto con los compuestos y las estructuras que se perciben en la boca como la textura y/o estructura del alimento²⁹.

La calidad en los alimentos comprende muchos aspectos, entre los que se incluyen inocuidad, valor nutricional y estabilidad. Sin embargo, la aceptación de un alimento esta basado en sus propiedades sensoriales como son su olor, sabor, color, textura y apariencia; todo esto como resultado de una compleja interacción entre los humanos y el alimento.

Es de conocimiento general, que el análisis a los compuestos volátiles en los alimentos no es suficiente para describir la complejidad de los sabores; como consecuencia, el análisis sensorial se hace fundamental para determinar la calidad y el grado de aceptación de los productos. No obstante las estimaciones con instrumentación analítica has sido muy demandadas ya que proveen información muy valiosa³⁰.

El aroma constituye un papel importante en el desarrollo de la calidad comestible óptima. Los compuestos volátiles producidos por las frutas siguen teniendo importancia en la determinación del grado de aceptación del consumidor. Así pues, una sola fruta puede tener un centenar de compuestos volátiles, los cuales pueden diferir según su estado de maduración, si esta se encuentra en un estado avanzado pueden presentarse volátiles propios de la fermentación; estos suelen relacionarse con la aparición de olores y sabores anómalos o desagradables (“off-flavours”). En la fresa estos volátiles están formados básicamente por acetaldehído¹⁶, etanol¹⁶ y acetato de etilo^{16,31}.

2.6 Identificación de compuestos volátiles

Las variedades de fresas pueden caracterizarse por su composición química y más precisamente por su composición química de volátiles. En este caso Microextracción en fase Sólida (MEFS) en su modo de Headspace, acompañado con la cromatografía de gases

nos confirmara la presencia de estos compuestos volátiles si se comparan los tiempos de retención de las muestras con tiempos de retención de estándares³², pero si el análisis lo requiere, la espectrometría de masas (EM) es más específica.

2.7 Microextracción en fase sólida

La Microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica utilizada en química analítica en la cual se extraen compuestos químicos para su posterior identificación y cuantificación. Fue desarrollada a principios de los años noventa por el equipo del Dr. Pawliszyn en la Universidad de Waterloo. Esta técnica relativamente económica se puede implementar tanto en el laboratorio como en el campo y no requiere el uso de disolventes³³. Es más rápida y simple que otras técnicas, esto implica que muchas muestras pueden ser procesadas, generando un mayor número de datos³⁴.

2.7.1 Proceso de extracción

El proceso de MEFS puede sintetizarse en dos pasos: partición del analito entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra, seguida de una desorción de los extractos concentrados dentro de un instrumento analítico. En el primer paso el recubrimiento de la fibra es expuesto a la muestra o a su espacio de cabeza o headspace (HS, ver figura 4) la cual causa que el analito deseado vaya de la matriz de la muestra a el recubrimiento. La fibra con los analitos concentrados es posteriormente transferida dentro de un instrumento para su desorción donde la separación y cuantificación de los extractos puede llevarse a cabo. En lo que respecta a la etapa de desorción, ésta se realiza térmicamente o bien por adición de un disolvente orgánico, dependiendo de la técnica analítica que se utilice. Así, si la MEFS se acopla a la CG, la desorción se realiza

térmicamente. La cromatografía de gases permite cuantificar los compuestos separados y en algunos casos identificarlos, aunque para corroborar los resultados, la espectrometría de masas se usa como confirmación ³⁵.

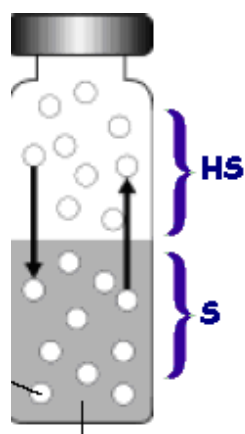


Figura 4³⁶. La muestra se presenta en la parte inferior señalada como S en el diagrama, mientras que el espacio de cabeza o headspace (HS) es el aire contenido entre la muestra y el tapón del vial. Los puntos blancos representan los componentes volátiles que difunden de la muestra hacia el espacio de cabeza.

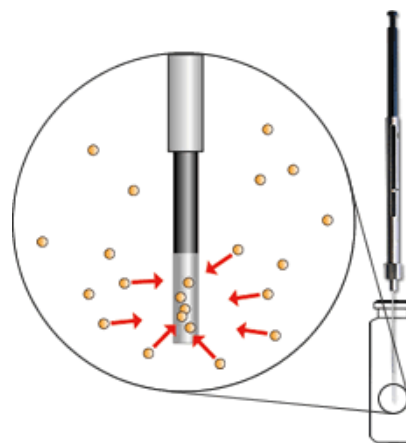


Figura 5³⁷. Adsorción de los analitos en el recubrimiento de la fibra

2.7.2 Fibras para la MEFS

Actualmente hay fibras comercialmente disponibles (Tabla 4), con diferentes recubrimientos de manera que la MEFS puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de Polidimetilsiloxano (PDMS) y Poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones.

Tabla 4. Diferentes tipos de fibras con sus aplicaciones³⁸

Espesor/fase estacionaria	Temp. máxima de uso (°C)	Polaridad	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)			
100 µm, fase no enlazada	280	No polar	CG/HPLC
30 µm, fase no enlazada	280	No polar	CG/HPLC
7 µm, fase enlazada	340	No polar	CG/HPLC
Polidimetilsiloxano Divinilbenceno (PDMS/DVB)			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	270	Bipolar	CG
60 µm, fase parcialmente entrecruzada	--	Bipolar	HPLC
65 µm, fase muy entrecruzada	270	Bipolar	CG
Poliacrilato (PA)			
85 µm, fase parcialmente entrecruzada	320	Polar	CG/HPLC
Carboxen / Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS)			
75 µm, , fase parcialmente entrecruzada	320	Bipolar	CG
85 µm, , fase muy entrecruzada	320	Bipolar	CG
Carbowax-Divinilbenzeno (CW/DVB)			
75 µm, , fase parcialmente entrecruzada	265	Polar	CG
85 µm, , fase muy entrecruzada	265	Polar	CG
Carbowax-Plantilla de resina (CW/TPR)			
50 µm, , fase parcialmente entrecruzada	--	Polar	HPLC
Divinilbenceno-Carboxen-Polidimetilsiloxano (DVB/CAR-PDMS)			
50/30 µm, , fase muy entrecruzada	27	Bipolar	CG

Estos recubrimientos satisfacen muchas de las necesidades para el análisis de compuestos orgánicos. Naturalmente la naturaleza química del analito determina el tipo de recubrimiento a utilizar. La simple regla general de lo similar atrae lo similar puede aplicarse aquí. El conocimiento de otra técnica de extracción también puede ser de mucha ayuda ya que la actividad que se puede obtener está basada primordialmente en la polaridad y volatilidad entre las diferentes moléculas.

PDMS es el recubrimiento más usado. El recubrimiento más popular para el muestreo es la fase de PDMS, y cada vez que se pueda debe ser utilizada. La fase de PDMS es una fase no polar y esta extrae muy bien analitos no polares. Sin embargo, esta puede ser usada exitosamente para extraer muchos compuestos polares, particularmente después de la optimización de las condiciones de extracción³³.

Por otro lado la fase PA es apropiada para compuestos polares como lo pueden ser los fenoles. Este es un polímero sólido de baja densidad a temperatura ambiente, lo cual permite al analito unirse al recubrimiento, pero los coeficientes de difusión son más bajos comparados con PDMS resultando en tiempos de retención más largos para analitos volátiles en el espacio de cabeza³².

Las fibras con mezcla de fases son las más apropiadas para compuestos volátiles. La mezcla de fases en los recubrimientos tiene propiedades complementarias comparadas con las de PDMS y PA. La mayor interacción es determinada por el proceso de adsorción en las partículas de Divinilbenceno, estas son más apropiadas para compuestos volátiles, y la constante de distribución resultante es típicamente mayor comparada con la de PDMS.

Cambiando el “pegamento” de PDMS a Carbowax resulta en una selectividad diferente hacia compuestos polares como cetonas y alcoholes³³.

2.7.3 Tipos de extracción

Existen tres tipos básicos de extracción: extracción directa, headspace y extracción protegida con membrana. En el modo de extracción directa la muestra se sumerge directamente en muestras líquidas y los analitos son transportados directamente de la matriz de la muestra hacia la fase de extracción (fibra). En el modo de headspace la fibra se expone en la fase vapor o espacio de cabeza (HS) que existe sobre la muestra sólida o líquida; los analitos son transportados a través del aire enriquecido hacia la fibra, además la MEFS permite modificar la matriz de la muestra como el cambio de pH sin dañar la fibra. En el modo de extracción protegida con membrana la fibra se protege utilizando una membrana que sirve como barrera³³.

2.7.4 Selección del modo de extracción

La Selección del modo de extracción se hace considerando la matriz de la muestra, la volatilidad del analito y su afinidad con la matriz. Para muestras muy sucias, las cuales pudieran tener sustancias que dañen el recubrimiento de la fibra cambiar sus propiedades de adsorción, el modo de headspace o la fibra con protección deben ser usados. Para matrices limpias se puede considerar introducir la fibra directamente.

Sin embargo, para compuestos volátiles, la extracción en el modo de headspace sigue siendo preferida debido a que alcanza rápidamente el tiempo de equilibrio. La protección con membrana debe ser usada únicamente para muestras muy sucias y en casos de que no se puedan aplicar los otros dos modos³².

2.7.5 Variables que afectan el proceso de MEFS

El proceso de MEFS se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción.

La MEFS en su modo de headspace generalmente se aplica a compuestos de mediana a alta volatilidad. En muestras acuosas, es difícil usar este método satisfactoriamente ya que se tienen analitos con alta polaridad, como ácidos y bases, los cuales tienen una alta afinidad por la matriz. Esta situación puede mejorarse cambiando ciertas situaciones como por ejemplo el pH de la matriz. Las aplicaciones del headspace también pueden extenderse a la extracción de compuestos semivolátiles y analitos fuertemente unidos a la matriz de la muestra si se extiende el tiempo de extracción y la temperatura. A continuación se muestran las variables experimentales que hay que tomar en cuenta para mejorar la eficiencia de la extracción ³⁵.

2.7.5.1 Agitación de la muestra

La composición de los alimentos afecta la liberación de los componentes volátiles, ya que estos pudieran ser disueltos, adsorbidos, encapsulados, atrapados o tener una difusión limitada por otros componentes del alimento²⁹. La agitación de la muestra, incrementa la difusión de los analitos desde la matriz de la muestra a la fibra o al espacio de cabeza por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio. La efectividad de la agitación determina el tiempo de equilibrio en una muestra acuosa.

El tiempo de equilibrio en una muestra gaseosa es más rápido y solo es limitado por el tiempo de la difusión del analito hacia el recubrimiento de la fibra. Una situación similar ocurre cuando analitos muy volátiles son analizados por la técnica de headspace. En este caso, muchos de los analitos que están en el headspace se extraen relativamente rápido

aunque no se utilice agitación. Sin embargo, la agitación es requerida para facilitar el transporte de masa entre la mayor parte de la muestra acuosa y la fibra.

La agitación magnética es la forma más común de agitación en el modo de MEFS desde que está disponible y ha sido usada en la mayoría de los experimentos en laboratorios de química analítica³²; además la agitación se puede usar con los tres tipos de MEFS. La extracción es más eficiente cuando una mayor velocidad de agitación es empleada.

Algunas precauciones deben advertirse cuando se usa agitación magnética en la MEFS frecuentemente la velocidad rotacional de la barra magnética no es controlable o constante, lo cual puede ocasionar variaciones en las condiciones de agitación durante la extracción y cambiar el tiempo de equilibrio. El efecto neto de esto puede ser una pobre precisión. También, la base puede calentarse durante la agitación lo que resulta en cambios en la constante de distribución, lo cual también afecta la reproducibilidad de las mediciones.

Existen otras alternativas para agitar las muestras que también pueden considerarse. La siguiente tabla muestra otros métodos de agitación con sus ventajas y desventajas.

Tabla 5. Métodos de agitación en MEFS³³

Método	Ventajas	Desventajas
Estático (sin agitación)	Fácil, ideal para muestras gaseosas	Solo para analitos muy volátiles
Agitación magnética	Equipo común, buen rendimiento	Requiere de una barra magnética en el vial, pudiera salpicarse la fibra debido al movimiento de la barra.
Vortex / mover el vial	Buen rendimiento, no necesita de barra magnética	Estrés en la fibra
Movimiento de la fibra	Buen rendimiento, no necesita de barra magnética	Estrés en la fibra, limitado a volúmenes pequeños
Sonicación	Tiempos de extracción muy cortos	Ruidoso, se calienta la muestra

2.7.5.2 Tiempo de extracción

El tiempo de extracción en SPME es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al desarrollar un método analítico basado en SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico de cada analito-fibra e intentar trabajar en esas condiciones. El tiempo de equilibrio es aquél a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar a esta situación es muy elevado por lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio y se seleccionan tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis^{39,40}. En estos casos es muy importante controlar estrictamente el tiempo de extracción ya que pequeñas oscilaciones en la medida del tiempo pueden variar de forma considerable la cantidad de analito extraída, tal y como se puede observar en la Figura 6.

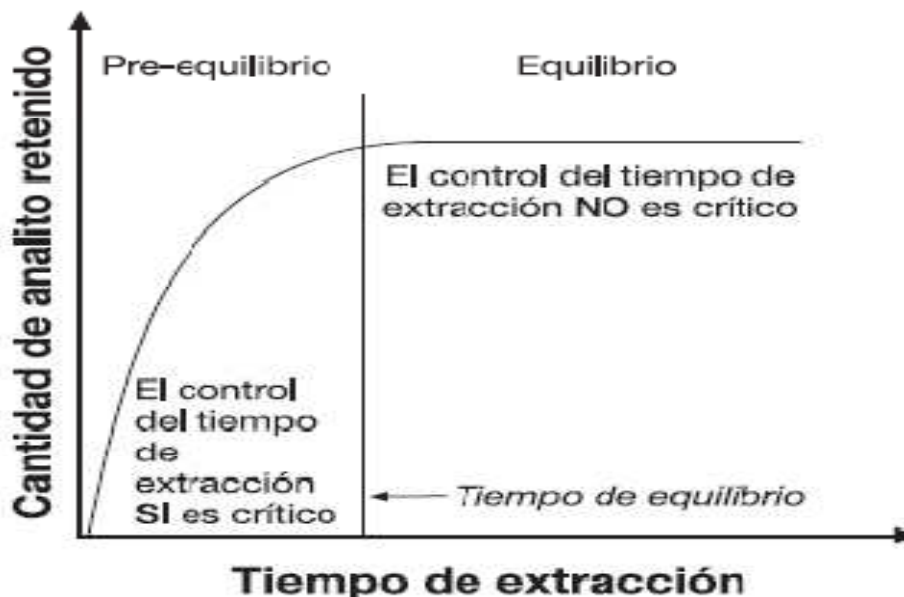


Figura 6. Efecto de la variación en la medida del tiempo de extracción en la cantidad de analito³².

La MEFS no es una técnica de extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de partición de los analitos, se tiene una relación proporcional entre la cantidad de analitos absorbidos por la fibra y su concentración inicial en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición. Por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo por MEFS³⁸.

2.7.5.3 Temperatura de extracción

Otro parámetro importante es la temperatura de extracción. Este parámetro contribuye de dos formas completamente opuestas en el proceso de MEFS. Por un lado, los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída. En HS-SPME, además, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza por lo que la extracción es también más rápida. Por otro lado, un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se ve afectada negativamente³³.

2.7.5.4 Adición de sales

La presencia de sales, (generalmente se utiliza NaCl aunque en algunos casos se han utilizado otras sales como Na₂SO₄)³² en la muestra aumenta el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Sin embargo, si los analitos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución. En consecuencia, el pH de la muestra es otro factor a tener en cuenta en la optimización del

proceso de SPME ya que los analitos deben estar siempre presentes en la muestra en su forma neutra para su extracción. Por ejemplo, para que los analitos estén presentes en la forma neutra, es recomendable trabajar a valores de pH al menos dos unidades por debajo de el pKa si los analitos son ácidos³⁵.

2.7.5.5 Desorción de los analitos

Los parámetros que afectan a la etapa de desorción dependen del tipo de desorción utilizado (térmica o por disolvente orgánico). Si ésta se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases, los parámetros a optimizar son la temperatura y el tiempo de desorción. La temperatura se recomienda fijarla a la máxima temperatura de uso de la fibra recomendada por el fabricante y el tiempo debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos de la fibra sea completa y no se presente el llamado efecto memoria. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos³³.

2.8 Cromatografía de gases

La complejidad de la muestra y la selectividad del proceso de extracción definen los requisitos para el instrumento de separación y cuantificación.

Con respecto a la cromatografía de gases esta es una técnica analítica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Existen dos tipos de cromatografía de gases (CG): la cromatografía gas-sólido (CGS) y la cromatografía gas-líquido (CGL), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (CG). La CG se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases. Éste consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector (Figura 7).

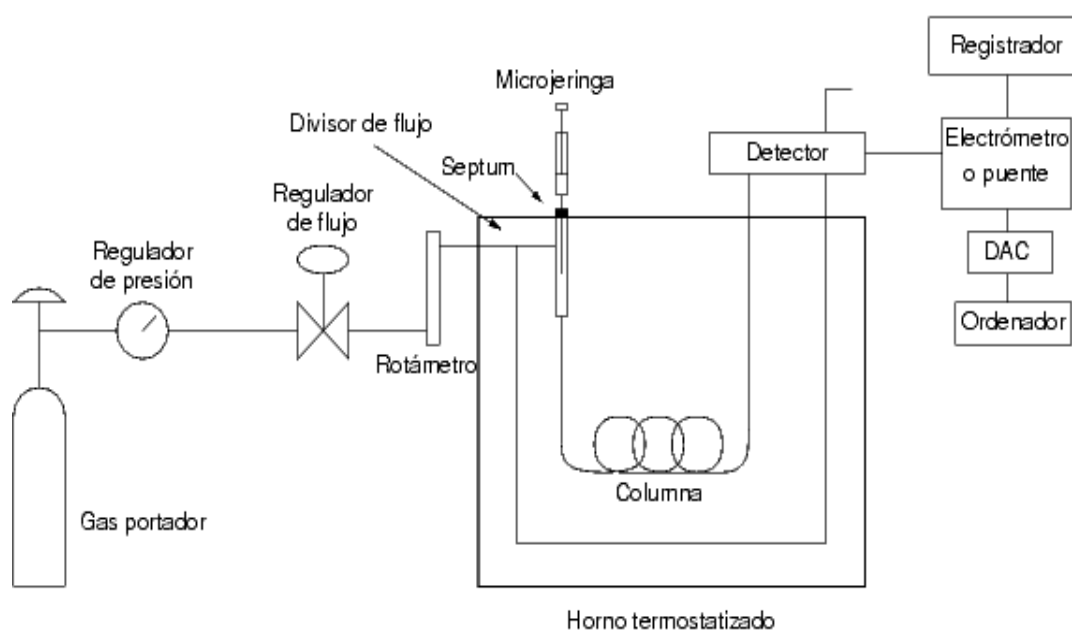


Figura 7. Diagrama general de un cromatógrafo de gases⁴².

El uso de un gas portador cumple básicamente dos propósitos: Transportar los componentes de la muestra, y crear una matriz adecuada para el detector. Un gas portador debe reunir ciertas condiciones:

Debe ser inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria), adecuado al detector a utilizar, debe ser capaz de minimizar la difusión gaseosa, puro, disponible y económico.

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma o septum.

En CG se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son más comunes en la actualidad (2009) debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas puede variar de 5 a 100 metros, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición del analito o analitos, y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él. Para estos valores, el tiempo de elución va a oscilar entre 2 y 30-40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada rampa de temperatura con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En muchas ocasiones, el ajustar correctamente la rampa puede significar separar bien o no los diferentes analitos. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elución ya que aunque a mayor temperatura la elución es más rápida, se corre el riesgo de descomponer el analito.

En el caso de los detectores este es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

- Sensibilidad
- Respuesta lineal al analito
- Tiempo de respuesta corto
- Intervalo de temperatura de trabajo amplio
- Estabilidad y reproducibilidad, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.
- Respuesta semejante para todos los analitos, o
- Respuesta selectiva y altamente predecible para un reducido número de analitos⁴².

Para el fin de este proyecto es adecuado el uso de la cromatografía de gases ya que sirve como un método para separar los diferentes componentes volátiles en la muestra.

2.8 Espectrometría de masas

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas⁴³, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc.

Sus principales cualidades son⁴⁴:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt e incluso ppq.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas.

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares (M^+) también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ión será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra,

suponiendo que se trate de una sustancia pura, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto químico y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con los espectros de una colección de espectros (o librería) y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen, etc^{45,46}.

2.10 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La técnica analítica acoplada Cromatografía de gases – Espectrometría de masa (CG-EM) es la más ampliamente utilizada para mezclas complejas.

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar⁴⁵.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema

complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de las dos técnicas, CG y EM da lugar a una técnica combinada CG-EM que permite la separación e identificación de mezclas complejas.

Usualmente se emplea espectrometría de masa para la confirmación de la identidad o estructura de las señales cromatográficas⁴³.

Esta técnica es muy sensible ya que alcanza límites de detección del orden de picogramos, puede ser altamente selectiva y adecuada por la flexibilidad con respecto al tipo y calidad del espectro de masas, el analista puede escoger entre diferentes tipos de ionización existentes y monitoreo selectivo de iones, ya sea barrido total de iones (SCAN por su nombre en inglés) o monitoreo selectivo de iones (SIM por sus siglas en inglés), el control del intervalo y resolución de masas, así como otros parámetros experimentales. La sensibilidad y selectividad se pueden mejorar a través del uso de técnicas de ionización química selectiva y/o técnicas de monitoreo selectivo de iones⁴⁵.

El espectro de masa obtenido es característico del analito, es decir es único. El perfil de iones en un espectro de masas resulta de la fragmentación de una molécula la cual la caracteriza y diferencia de otras moléculas y otros grupos de compuestos. Sin embargo, cada familia de compuestos exhibe algunos patrones de fragmentación característicos de los espectros de masas, esta información es útil en la propuesta de su identidad. Dentro de los constituyentes del aroma y sabor se encuentran aldehídos, cetonas, ácidos, ácidos grasos, aminas, amidas y hasta compuestos heterocíclicos los cuales exhiben sus propios patrones de fragmentación⁴³.

En resumen, una mezcla de compuestos inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas^{45,46}.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar los compuestos volátiles y semivolátiles que se encuentran en diferentes muestras de fresas usando microextracción en fase sólida (MEFS) seguido de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) para la caracterización química de estas.

3.2 Objetivos particulares

- Demostrar la utilidad del método de Headspace-MEFS-CG para el análisis de aromas de frutas y más específicamente de fresas.
- Establecer una metodología con las condiciones óptimas para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles en fresas.
- Cuantificar algunos de los compuestos mayoritarios identificados.
- Analizar si se altera la composición de compuestos volátiles y semivolátiles en las fresas si se aplica un desinfectante de frutas.

4 DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Materiales y equipo

- Fibras para MEFS: Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS-DVB 65 μ m) y Polidimetilsiloxano (PDMS 100 μ m)
- Soporte de la fibra para inyección manual (Supelco Bellefonte P.A., USA)
- Balanza analítica Startorius modelo CP124S
- Parrilla con agitador magnético PMC modelo 720 series
- Agitador Vortex Thermoline
- Estufa de secado J.M.Ortíz
- Agitador magnético de 5 mm x 3 mm
- Viales de vidrio de 12 mL con tapón horadado de polipropileno con septa de teflón.
- Exprimidor de limones
- Jeringas de vidrio Hamilton de 10, 50 y 100 μ L
- Material de vidrio común del laboratorio
- Pinzas para soporte universal

4.1.2 Reactivos

Alcohol etílico absoluto (99.2% de pureza), Analytyka, México. Cloruro de Sodio (99.5% de pureza), Monterrey, México. Agua desionizada.

4.1.3 Estándares

Linalol (97% de pureza), Nerolidol (98% de pureza), Éster metílico de ácido hexanoico (99.8% de pureza), Fluka Chemika, Sigma Aldrich, Suiza. Éster etílico de ácido hexanoico (>99% de pureza), -CHECK-PREP, USA.

4.1.4 Muestras

Se analizaron fresas de cuatro diferentes lugares de cultivo, las cuales se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Características de las muestras utilizadas en el análisis de acuerdo a la NMX-FF-062-SCFI-2002 PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - FRUTA FRESCA - FRESA (*Fragaria xananassa*, Dutch) – ESPECIFICACIONES Y MÉTODO DE PRUEBA (Ver Anexo)

Muestras analizadas	Lugar de Origen	Lugar de Compra	Características Físicas Y Sensoriales
1	California ,E.U.A	Superama	Tamaño A, estado de maduración 6, sabor ligeramente dulce y poco aromáticas.
2	Irapuato, Guanajuato	Central de abastos	Tamaño D, estado de maduración 6, de sabor dulce y muy aromático.
3	Panindícuaro, Michoacán	Mercado local en Morelia, Michoacán	Tamaño B, estado de maduración 6, sabor dulce y muy aromáticas.
4	Jocotepec, Jalisco	Walmart	Tamaño A, estado de maduración 6, sabor ligeramente dulce y poco aromáticas.

4.1.4.1 Preparación de la muestra

A las fresas limpias se les separó el pedúnculo, fueron cortadas en trozos pequeños y puestas en el exprimidor de limones para estrujarlas y obtener el jugo; obteniéndose aproximadamente 20 mL. Este procedimiento se realizó para cada muestra de fresas analizadas.

4.2 Análisis cromatográfico

4.2.1 Condiciones cromatográficas

Se utilizó un Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Serie 5971 (ver figura 8) acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5971 con inyector split/splitless y una columna capilar de sílice fundida (5% fenil 95% dimetilpolisiloxano) de 30m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm grosor de película (Zebron Phenomenex, USA).

Se utilizó He como gas acarreador a flujo constante de 2 mL/min. La temperatura del inyector fue de 250 ° C modo split (1 min), la temperatura de la línea de transferencia fue de 280 ° C, la temperatura de la fuente de ionización fue de 230 ° C y la temperatura del analizador (cuadrupolar) de 150 ° C. El análisis se realizó por impacto electrónico a 70 eV; se utilizó el modo de barrido total del espectro (SCAN, por sus siglas en inglés) de 50 a 550 m/z para la identificación de los compuestos.

Programa de temperatura: Temperatura inicial 40° C isotermicamente durante 2 minutos, rampa de 8°C/minuto hasta 300°C manteniendo esta temperatura durante 2 minutos.



Figura 8. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas utilizado en este trabajo (optimización de parámetros, análisis de muestra y cuantificación)

4.2.2 Identificación de compuestos

Los compuestos fueron identificados de acuerdo a los espectros de masas obtenidos y comparados con los de la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library versión 2.0 build 19 Nov 2001). Algunos compuestos fueron identificados comparando los tiempos de retención con sus estándares.

4.2.3 Cuantificación de compuestos

Para la cuantificación se utilizó una recta de calibración para cada analito a cuantificar. Para la elaboración de esta, se preparó una solución patrón de 10 mL disolviendo una gota del estándar puro en etanol (0.0116 g promedio), para posteriormente tomar una alícuota y llevarla a un aforo de 5 mL con etanol. De esta solución diluida tomar la alícuota adecuada y colocarla en un vial con 1 mL de agua desionizada y llevarlo a un volumen de 3 mL.

Realizar el mismo procedimiento (ver sección 5.2) seguido en la extracción de compuestos volátiles en las muestras de fresa.

4.3 Microextracción en fase sólida

4.3.1 Dispositivo para la MEFS

Se utilizó un vial de vidrio con tapón horadado y septum de teflón (ver figura 9) con capacidad de 8 mL para colocar la muestra y realizar la MEFS.



Figura 9. Viales utilizados para la MEFS. Se pueden distinguir la muestra en color rojo y el espacio restante entre la muestra y el tapón se conoce como espacio de cabeza o headspace

A este vial se transfirieron 3 mL de jugo de fresa y se colocó en un recipiente con agua para mantener la temperatura constante. Una vez sujeto el vial con pinzas para soporte se introdujo el soporte de la fibra y este también se sujetó con pinzas para soporte universal. La figura 10 muestra el dispositivo.



Figura 10. Dispositivo empleado para la MEF

4.3.2 Optimización de los parámetros de MEFS

Antes de iniciar con el desarrollo de la metodología fue necesario realizar pruebas para mejorar la eficiencia durante la extracción; ya que como se ha mencionado hay diversos factores que se pueden modificar para optimizar este proceso. Los factores que se optimizaron fueron: tiempo de extracción, tipo de fibra, efecto de agitación, fuerza iónica y temperatura. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

4.3.2.1 Selección de fibra

En el presente trabajo se evaluaron dos tipos de fibras; la PDMS y la PDMS/DVB, estas pruebas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y la extracción durante 60 minutos. Las fibras fueron acondicionadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Tabla 7).

Tabla7. Condiciones para el acondicionamiento de fibras.

Fase Estacionara	Grosor de Película(μm)	Temp.de acondicionamiento($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de acondicionamiento (Hrs)
PDMS	100	250	1
PDMS-DVB	65	260	0.5

4.3.2.2 Efecto de la agitación

El efecto de la agitación se estudio realizando extracciones sin agitación y con agitación a 1400 rpm. Las condiciones de extracción fueron: extracción en la fibra PDMS/DVB durante 60 minutos a temperatura ambiente.

4.3.2.3 Tiempo de extracción

Para determinar la influencia del tiempo de extracción se decidió hacer pruebas de extracción a 20 y 60 minutos, estas pruebas se realizaron usando la fibra de PDMS/DVB a temperatura ambiente.

4.3.2.4 Temperatura de extracción

Se evaluó el efecto de la temperatura realizando extracciones a 21° C (temperatura ambiente en ese momento), 30 y 40 °C. Bajo las condiciones señaladas en el inciso anterior.

4.3.2.5 Efecto de la adición de sal

Para el estudio del efecto de la fuerza iónica se adicionó diferentes porcentajes de NaCl de acuerdo a su punto de saturación; de esta manera se tiene que el NaCl alcanza su saturación si se le adicionan 1.07 g de esta a 3 mL de agua a una temperatura de 22°C.

Se realizaron extracciones con la fibra PDMS DVB durante 60 minutos adicionando las siguientes cantidades de NaCl: 1.07 g (saturación de la solución), 0.538 g (50% respecto a su saturación), 0.269 g (25% respecto su saturación) y un blanco (0% de NaCl).

4.4 Adición de desinfectante

Para comprobar si la adición de desinfectante modifica el aroma en las muestras de fresas se utilizó el microbicida Microdyn. De acuerdo a las especificaciones se dejaron las fresas en un litro de agua, se agregaron 8 gotas del desinfectante y se dejaron reposar durante 10 minutos. Estas fresas se secaron y se elaboro el jugo para las determinaciones correspondientes. El procedimiento seguido fueron las condiciones optimizadas para la extracción de compuesto volátiles en fresas (ver seccion 5.2)

5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 Determinación de las condiciones de trabajo

Previamente al análisis de las diferentes muestras se procedió a optimizar las condiciones de extracción de los analitos en la fibra. Para la determinación de las condiciones de microextracción se estableció un tiempo de equilibrio entre la muestra y la disolución de 5 minutos.

5.1.2 Selección de fibra

Para el análisis de compuestos volátiles en fresas se hicieron pruebas con dos tipos de fibra: la PDMS que tiene una fase estacionaria no polar y la PDMS/DVB que es bipolar en cuanto a su composición; es decir tiene fase estacionaria polar y no polar.

La Tabla 8 muestra los compuestos extraídos con la fibra PDMS, obteniéndose un total de 13, si se compara con los 46 compuestos extraídos con la fibra PDMS/DVB esta última resulta ser mas eficiente ya que no solo extrajo más compuestos sino también picos cromatográficos con una mayor altura. Para apreciar estas diferencias la Figura 11 muestra dos cromatogramas sobrepuestos de las extracciones hechas con estas fibras.

La característica más notable de estos cromatogramas es su complejidad; a simple vista se observan algunos picos en común, sobre todo los picos mas largos. Aunque esta claro que al ser los compuestos volátiles de la fresa una mezcla muy compleja la cual consiste de diferentes compuestos en lo que se refiere a grupos químicos y pesos moleculares, la fibra con fase estacionaria de PDMS/DVB obtuvo mejores resultados debido a su capacidad para adsorber tanto analitos polares y no polares.

Tabla 8. Compuestos extraídos con la fibra PDMS/DVB (* son los compuestos extraídos con ambas fibras).

Compuestos			
1	Ácido 2-metil-butanoico	24	Metil éster de ácido butanoico
2	Ácido hexanoico	25	Metil éster de ácido hexanoico*
3	Ácido 2-metil-hexanoico	26	Fenilmetil éster de ácido acético*
4	Hexanol	27	Metil éster de ácido octanoico*
5	3-Metil-1-pentanol	28	Butil éster de ácido acético
6	Octanol	29	(E)-2-Hexen-1-ol acetato
7	Nonanol	30	(Z)-3-Hexen-1-ol acetato
8	E-11,13-Tetradecadien-1-ol	31	Butil éster de ácido butanoico
9	Nonanal	32	Hexil éster de ácido acético*
10	2-Octanona	33	Hexil éster de ácido butanoico*
11	2-Nonanona	34	Octil éster de ácido acético*
12	2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona*	35	2-Propen-1-ol,3-fenil acetato
13	Étil éster de ácido butanoico	36	Octil éster de ácido butanoico*
14	1-Metil etil éster de ácido butanoico	37	Etano-1,1-diol dibutanoato
15	Étil éster de ácido pentanoico	38	Ciclofenchene
16	1-Metil etil éster de ácido butanoico	39	D-Limoneno
17	3-Metil etil éster de ácido butanoico	40	Isoterpinoleno
18	Étil éster de ácido 2-hexenoico	41	Biciclo hept-4-en-3-ol, 3,7,7-trimetil
19	Étil éster de ácido hexanoico*	42	Linalol*
20	Étil éster de ácido benzoico	43	α -Muroleno
21	1-Metiletil éster de ácido hexanoico	44	\pm -Trans-Nerolidol*
22	Étil éster de ácido octanoico	45	Diclorometano*
23	Étil éster de ácido decanoico	46	Tolueno*

Ya se había mencionado que las fibras con mezcla de fases son las más apropiadas para compuestos volátiles, además la mezcla de fases en los recubrimientos tiene propiedades complementarias comparadas con las de PMDS, lo que permite la adsorción de un mayor rango de compuestos.

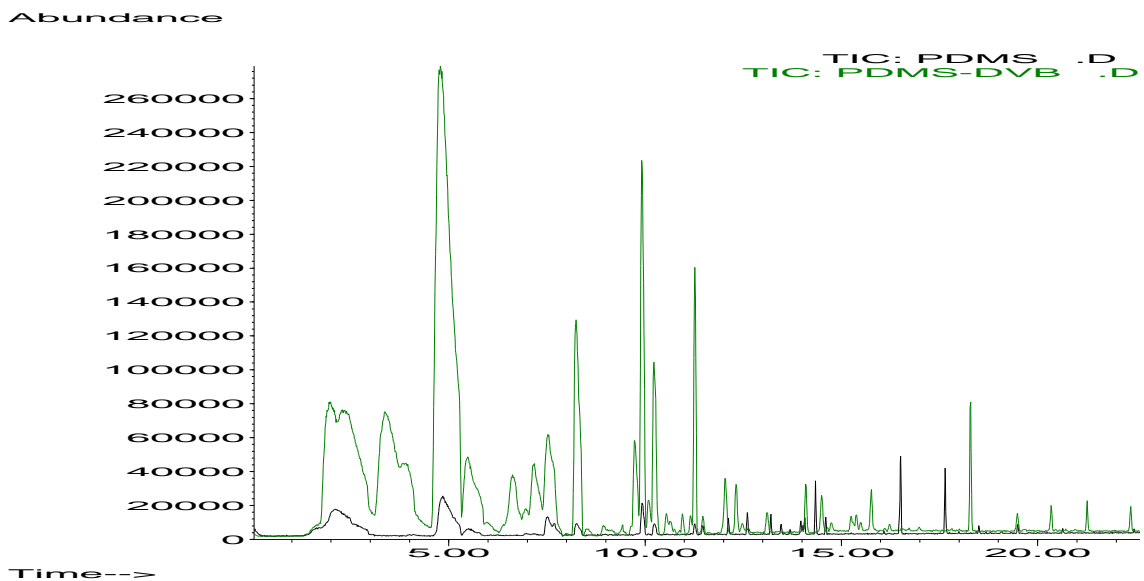


Figura 11. En color verde se observan los picos obtenidos para una extracción realizada con la fibra de PDMS/DVB. Los picos en color negro corresponden a la extracción realizada utilizando la fibra PDMS para la misma muestra de fresa.

Esta claro que el tipo de fibra afecta la selectividad de la extracción. Investigaciones similares^{33,47-51} sobre determinación de compuestos volátiles en diversas bebidas y frutas han reportado mejores resultados con el uso de fibras de mezcla de fases polares y no polares como lo es la fibra de PDMS-DVB.

5.1.3 Efecto de la agitación

Otra de las variables que se estudiaron para mejorar el proceso de extracción fue la agitación. Para este fin se realizaron extracciones utilizando una barra magnética y una parrilla de agitación. La Figura 12 muestra un cromatograma comparativo para una extracción con agitación y sin agitación.

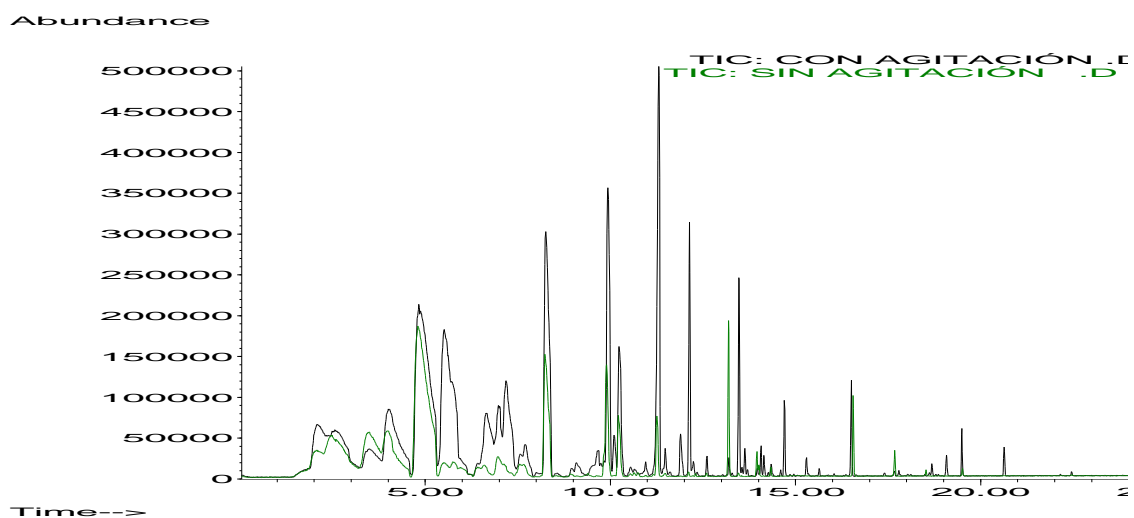


Figura 12. En color verde se observan los picos obtenidos a una extracción sin agitación para una muestra de fresa. Los picos en color negro corresponden a una extracción con agitación magnética para la misma muestra de fresa.

Se observa de manera clara que se obtienen mejores resultados al utilizar agitación ya que la altura de los picos se incrementa, en algunos casos notablemente, esto porque se logró extraer una mayor cantidad de analitos debido a que la agitación permite una mejor y mayor difusión desde la matriz hacia la fibra. Para ilustrar esta situación la Figura 13 presenta las áreas correspondientes para algunos compuestos extraídos.

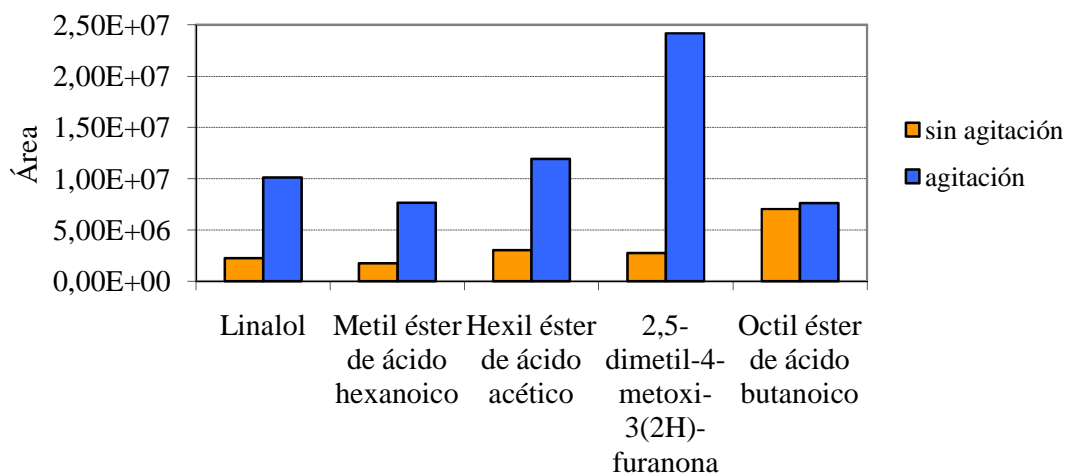


Figura 13. Las barras en color azul muestran las áreas de diferentes compuestos extraídos usando agitación magnética, mientras que en color naranja se muestran las áreas de los mismos compuestos para una extracción sin agitación.

Es clara la diferencia entre usar agitación y no usarla durante el proceso de extracción, resulta evidente para estos compuestos en particular, pero en general, se observó una mejora en cuanto a la extracción de todos los compuestos. Por estas razones se decidió usar agitación magnética durante la extracción de los compuestos volátiles.

5.1.4 Tiempo de extracción

Se seleccionó realizar las extracciones con un tiempo de 60 minutos ya que comparada con tiempos de extracción más cortos el número de analitos extraídos fue mayor; así como el área de los picos. Cuando la extracción se realizó durante 20 minutos se obtuvo un total de 12 compuestos, mientras que cuando se amplió el tiempo a 60 minutos se extrajeron 43 compuestos (Figura 14).

Hay que destacar que la MEFS no es una técnica de extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de partición de los analitos, se tiene una relación proporcional entre la cantidad de analitos absorbidos por la fibra y su concentración inicial

en la matriz de la muestra antes de alcanzar el equilibrio de partición; por lo tanto el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo por MEFS⁵² sin embargo, el tiempo de extracción se definió estrictamente y se mantuvo constante durante todos los análisis, tanto para muestras como en los estándares de calibración.

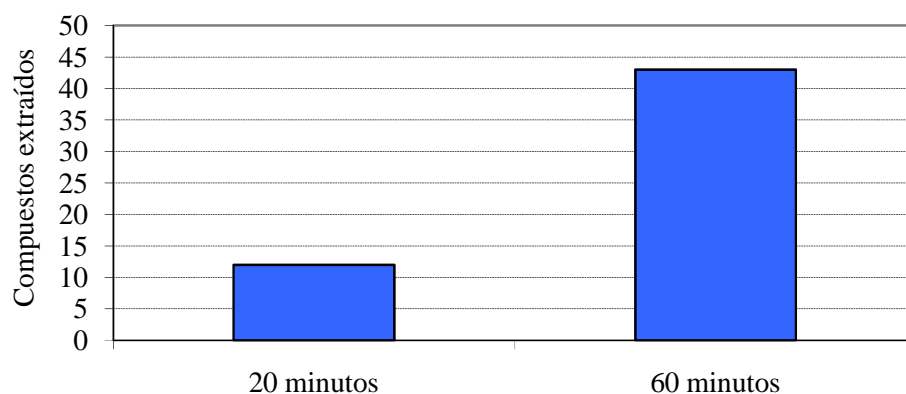


Figura 14. Gráfica comparativa de los dos tiempos de extracción utilizados.

Si el tiempo de extracción antes de llegar al equilibrio es relativamente largo, pequeñas variaciones en el tiempo de extracción no afectaran la precisión. Sin embargo, a tiempos de extracción muy cortos pequeñas variaciones en el tiempo de equilibrio pueden afectar significativamente la precisión, es por eso que 60 minutos es un intervalo de tiempo no tan largo como esperar al equilibrio de todos los componentes volátiles y no tan corto como para que se afecte la precisión.

Para el análisis de compuestos volátiles en fresas, puede resultar impracticable esperar a que se complete el tiempo de equilibrio, además se tiene un número grande de compuestos a identificar; para este caso, como ya se mencionó es de suma importancia ser muy exacto en el tiempo de extracción. 60 minutos es un tiempo adecuado para permitir la extracción de todos los analitos presentes en el espacio de cabeza. Algunos trabajos sobre identificación

de volátiles en diferentes alimentos reportan tiempos de extracción más cortos al utilizado en este trabajo. (5min^{49,50}, 10 min⁴⁸ y 30min^{34,51}).

5.1.5 Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor importante durante el proceso de extracción. Se decidió hacer extracciones aumentando la temperatura con el propósito de mejorar la eficacia del proceso. Se realizaron extracciones a 30 y 40 °C ya que se esperaba que al aumentar la temperatura aumentara la cantidad de analito extraído. En HS-MEFS al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza por lo que la extracción es también más rápida. Por otro lado, un aumento de la temperatura puede disminuir los coeficientes de distribución del analito entre la muestra y la fibra por lo que la eficacia de la extracción se puede ver afectada negativamente. La Figura 15 muestra un cromatógrama representativo de los analitos extraídos a 30°C para una muestra de fresa.

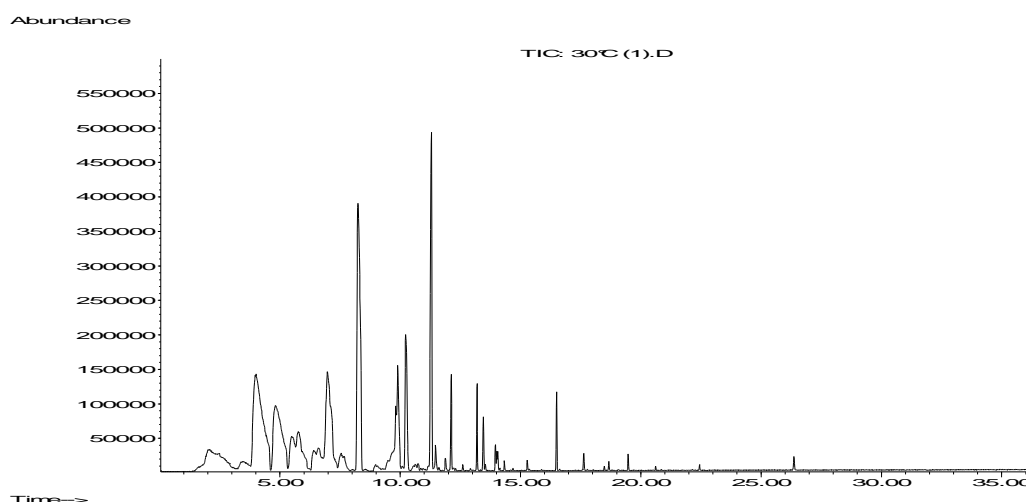


Figura 15. Cromatógrama de compuestos extraídos de una muestra de fresa a una temperatura constante de 30°C.

La Figura 16 muestra el cromatógrama para una misma muestra de fresa pero realizando la extracción a una temperatura constante de 40°C.

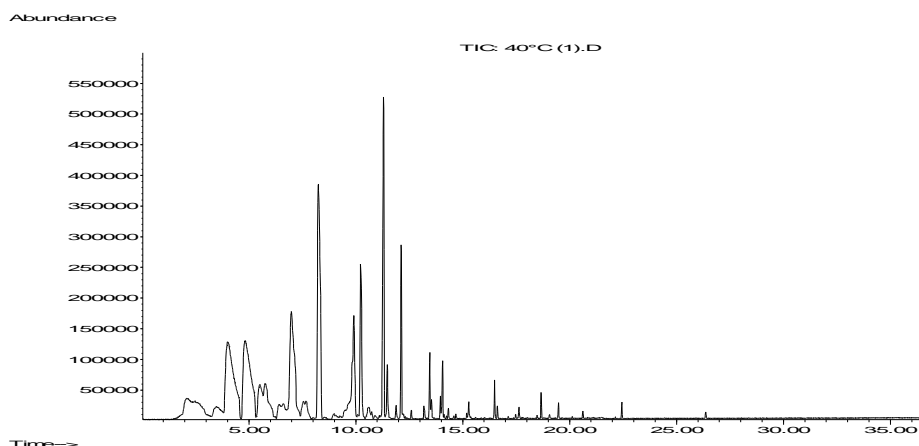


Figura 16. Cromatógrama de compuestos extraídos de una muestra de fresa a una temperatura constante de 40°C.

Un incremento a la temperatura de 10° C no modifica demasiado los picos de los compuestos extraídos. El cromatógrama comparativo (Figura 17) ejemplifica esta situación.

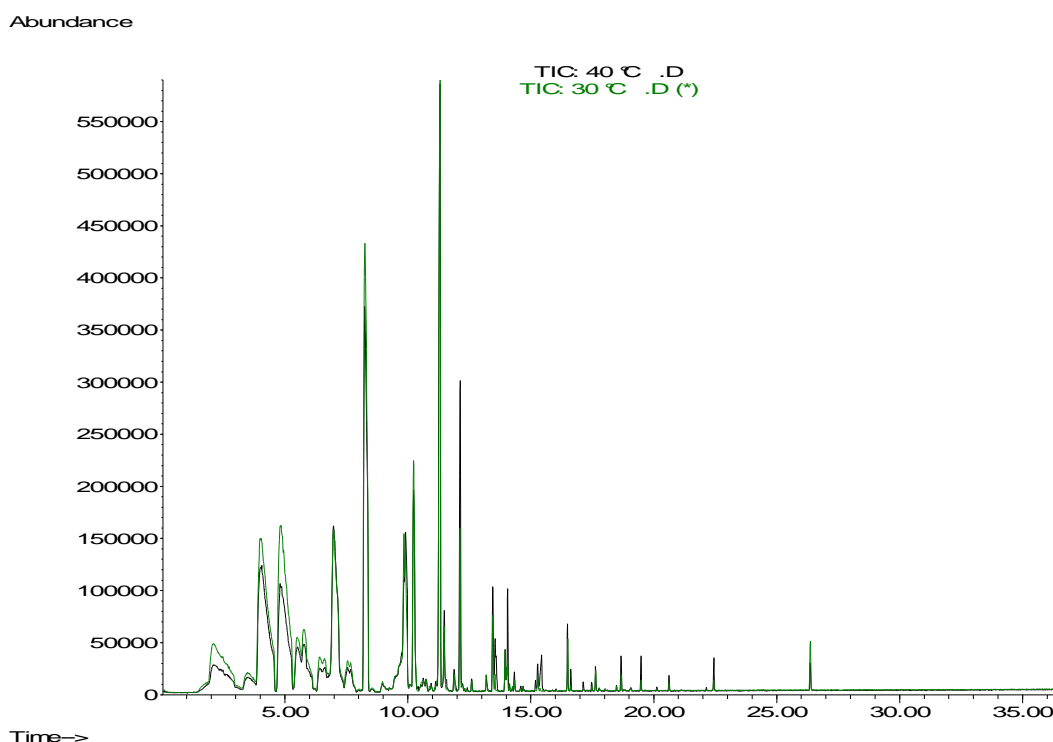


Figura 17. Cromatógramas sobrepuestos para extracciones realizadas a 30 y 40 °C.

Para ilustrar el efecto de la temperatura la Figura 18 muestra las áreas de 6 compuestos de los cromatógramas anteriores (Figuras 15 y 16). Para 3 de estos siete compuestos (linalol,

1-hexanol y \pm -trans-nerolidol) el área es un poco mayor si se realiza la extracción a 40°C, y lo mismo pasa con el resto de los terpenos encontrados. Mientras que para el 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona, hexil éster de ácido acético, y el metil éster del ácido hexanoico la extracción es mejor si se realiza a 30°C.

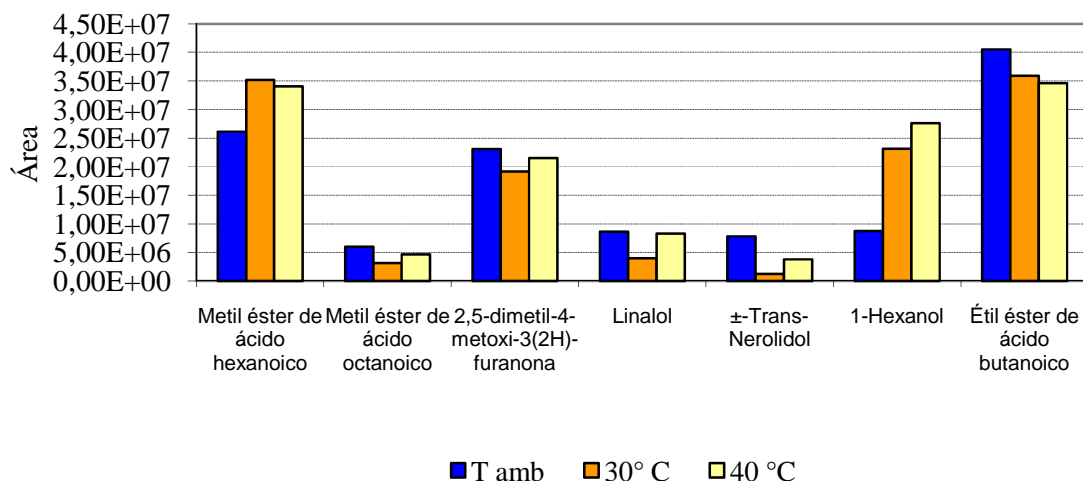


Figura 18. En color amarillo se muestran las áreas para extracciones realizadas a temperatura ambiente (21 °C). De color azul se muestran las áreas de diferentes compuestos extraídos a 30°C, mientras que en color naranja se muestran las áreas de diferentes compuestos extraídos a 40°C. Todas las extracciones fueron hechas para una misma muestra de fresa.

Al encontrar que al aumentar la temperatura se incrementaba la extracción de algunos de los compuestos y la de otros disminuye, se decidió llevar a cabo la extracción a temperatura ambiente ya que las fresas se consumen a esta temperatura.

5.1.6 Efecto de la adición de sal

Para observar el efecto de adición de NaCl la Figura 19 muestra al compuesto linalol y sus áreas cuando a la solución a extraer se le adicionaron diferentes concentraciones de sal con respecto a su punto de saturación en agua.

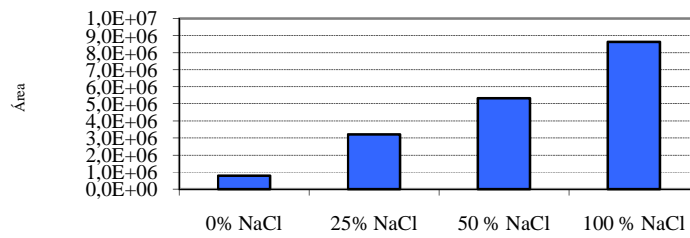


Figura 19. Gráfica comparativa donde se muestran las áreas correspondientes al linalol a diferentes porcentajes de NaCl necesarios para la saturación de la solución.

Para este caso en particular la adición de NaCl aumenta casi de manera lineal, el área en los picos cromatográficos. Se ilustra los efectos tomando como referencia al linalol ya que se trata de un terpeno, estos grupos de compuestos tienen una relevancia especial ya que son representativos del aroma, no solo en las fresas, sino también de otras frutas y diferentes plantas. Como se describe más adelante este compuesto resultó ser de los más representativos ya que se encontró en todas las muestras y en gran cantidad.

Al igual que en el inciso anterior la Figura 20 muestra los cromatogramas acoplados para los compuestos extraídos con y sin adición de sal.

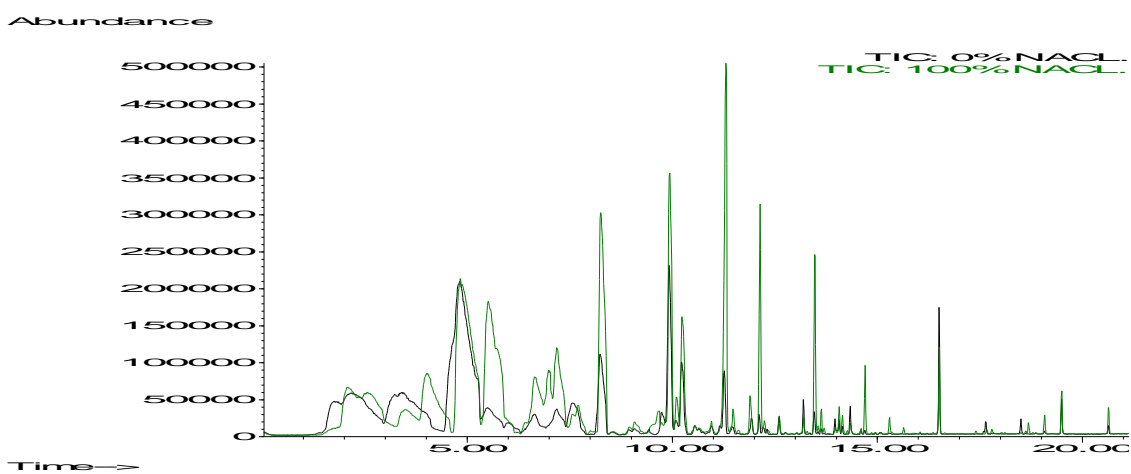


Figura 20. MEFS-HS de fresa. En verde se muestran los compuestos extraídos con 100 % de NaCl y en negro los extraídos de NaCl.

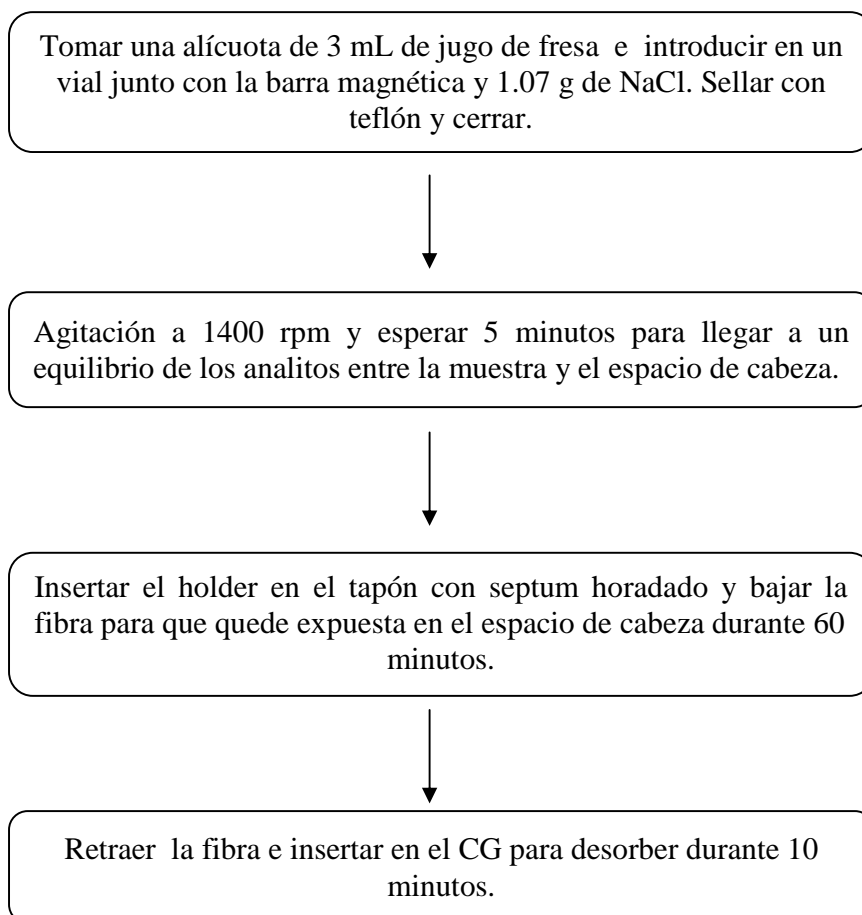
La adición de sal puede tener un efecto positivo o negativo en la extracción, según sea la naturaleza de los compuestos, debido a que no existe una cantidad de sal con la cual se tenga un máximo rendimiento para todos los compuestos, se decidió trabajar con una saturación del 100% de NaCl en la solución ya que aumento considerablemente la extracción en la mayoría de los compuestos. Como se ha mencionado la presencia de NaCl aumenta el coeficiente de distribución de los analitos presentes en la disolución lo que facilita el transporte de estos hacia la fibra. Sin embargo, si los analitos están en forma ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción. Esto se debe al aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución. Para este trabajo se decidió trabajar adicionando 1.07 g de NaCl que como se mencionó es el punto de saturación en agua para 3 mL a 20 °C.

5.2 Procedimiento seleccionado

Basado en los resultados obtenidos, las siguientes condiciones fueron seleccionadas para el análisis de volátiles y semivolátiles en las muestras de fresas.

- 60 minutos de extracción
- Temperatura ambiente
- Agitación con barra magnética (1400 rpm)
- Adición de 1.07 g de NaCl
- Fibra PDMS/DVB

El procedimiento propuesto fue el siguiente:



5.3 Identificación

Mediante CG-EM se identificaron un total de 77 compuestos volátiles, entre los que destacan ésteres (34), terpenos (14), alcoholes (7), ácidos (5), compuestos sulfurados (3), cetonas (3), furanos (2) y aldehídos (2).

Para poder distinguir mejor los compuestos obtenidos de la extracción de volátiles en las muestras de fresa, en la Tabla 9 presenta los compuestos identificados ordenados de acuerdo a los principales grupos funcionales.

Tabla 9. Compuestos identificados en el análisis de las cuatro muestras de fresa por MEFS-CG-EM. (● = identificado, -- = no identificado).

PM	Compuesto	Muestra				
		1	2	3	4	
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS						
1	102	Ácido 2-metil-butanoico	●	--	--	--
2	102	Ácido pentanoico	--	--	--	●
3	116	Ácido hexanoico	●	●	●	●
4	130	Ácido heptanoico	--	--	--	●
5	130	Ácido 2-metil-hexanoico	●	--	--	--
ALCOHOLES						
6	100	(E)-2-Hexen-1-ol	--	--	●	●
7	101	2-Metil-1-Penten-3-ol,	--	--	--	●
8	102	Hexanol	●	●	--	--
9	102	3-Metil-1-pentanol	●	--	--	--
10	130	Octanol	●	--	●	--
11	144	Nonanol	●	--	--	--
12	210	E-11,13-Tetradecadien-1-ol	●	--	--	--
ALDEHÍDOS						
13	98	(E)-2-Hexenal	--	●	●	--
14	142	Nonanal	●	--	--	--
CETONAS						
15	128	2-Octanona	●	--	--	--
16	142	2-Nonanona	●	--	--	--
17	142	4,5-Octanodiona	--	--	●	--
FURANOS						
18	142	2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona	●	●	●	●
19	170	5-Hexildihidro-2(3H)-furanona	--	●	●	--
ÉSTERES ETÍLICOS						
20	116	Etil éster de ácido butanoico	●	●	●	●
21	129	1-Metil etil éster de ácido butanoico	●	●	●	●
22	130	Etil éster de ácido pentanoico	●	--	--	--
23	130	1-Metil etil éster de ácido butanoico	●	--	●	●
24	131	3-Metil etil éster de ácido butanoico	●	--	--	●
25	142	Etil éster de ácido 2-hexenoico	●	●	--	--
26	144	Etil éster de ácido hexanoico	●	●	●	●
27	150	Etil éster de ácido benzoico	●	●	--	--
28	158	1-Metiletil éster de ácido hexanoico	●	●	--	--
29	172	Etil éster de ácido octanoico	●	--	--	--
30	200	Etil éster de ácido decanoico	●	--	--	--
ÉSTERES METÍLICOS						
31	102	Metil éster de ácido butanoico	●	●	●	●
32	130	2,2-Dimetil metil éster acido butanoico	--	--	--	●
33	130	Metil éster de ácido hexanoico	●	●	●	●

34	150	Fenilmetil éster de ácido acético	•	•	•	•
35	158	Metil éster de ácido octanoico	•	•	•	•
OTROS ÉSTERES						
36	100	2-Propenil éster de ácido acético	--	•	--	--
37	116	Butil éster de ácido acético	•	--	--	--
38	130	2-Metilpropil éster de ácido butanoico	--	•	--	--
39	130	Pentil éster de ácido acético	--	•	•	--
40	142	(E)-2-Hexen-1-ol acetato	•	•	--	--
41	142	(Z)-3-Hexen-1-ol acetato	•	•	•	•
42	144	Butil éster de ácido butanoico	•	--	--	•
43	144	Hexil éster de ácido acético	•	--	--	•
44	164	2-Feniletil éster de ácido acético	--	•	--	--
45	170	(E)-2-Hexenil éster de ácido butanoico	--	•	•	--
46	170	(Z)-3-Hexenil éster de ácido butanoico	--	•	•	--
47	172	Hexil éster de ácido butanoico	•	•	•	--
48	172	Octil éster de ácido acético	•	•	•	--
49	176	2-Propen-1-ol,3-fenil acetato	•	--	--	--
50	200	2-Metil-octil éster de ácido propanoico	--	--	•	--
51	200	Octil éster de ácido butanoico	•	•	•	•
52	202	Etano-1,1-diol dibutanoato	•	•	•	•
53	214	2-Metil-octil éster de ácido butanoico	--	--	•	--
SULFURADOS						
54	88	Metilito-2-propeno	--	•	•	•
55	120	3(Metiltio),ácido propanoico	--	--	--	•
56	134	3(Metiltio) metil éster de ácido propanoico	--	•	•	•
TERPENOS						
57	136	Ciclofenchene	•	•	--	--
58	136	D-Limoneno	•	•	--	--
59	136	Isoterpinoleno	•	•	--	--
60	151	Biciclo hept-4-en-3-ol, 3,7,7-trimetil	•	--	--	--
61	152	Trans-Óxido- limoneno	--	•	--	--
62	154	Eucaliptol	--	--	•	--
63	154	Linalol	•	•	•	•
64	154	α -Terpineol	--	•	•	•
65	154	Terpinen-4-ol	--	•	--	--
66	170	Cis- Óxido- Linalol	--	•	•	--
67	170	Trans- Óxido- Linalol	--	•	•	--
68	204	(Z)- β -Farneseno	--	•	•	--
69	204	α -Muroleno	•	--	--	--
70	222	\pm -Trans-Nerolidol	•	•	•	•
OTROS COMPUESTOS						
71	84	Diclorometano	•	--	--	--
72	92	Tolueno	•	--	•	•
73	112	Ciclopropano pentil	--	•	•	--
74	130	1-Butanal,3-metil acetato	--	•	--	--

75	146	2-Butoxi-etil acetato	--	--	--	•
76	158	Ácido butanoico anhidro	--	--	--	•
77	214	Ácido hexanoico anhidro	--	--	--	•

Las cuatro muestras analizadas difieren bastante en cuanto a composición de volátiles y semivolátiles encontrados, ya que de los 77 compuestos, solo 14 se identificaron como comunes en todas las muestras (Tabla 10). Cabe destacar que se trata de 1 ácido, 2 terpenos, 10 ésteres y 1 furanona.

Tabla 10. Principales componentes volátiles y semivolátiles identificados
Compuestos identificados en las cuatro muestras

1	Ácido hexanoico
2	2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona
3	Étil éster de ácido butanoico
4	1-Metil etil éster de ácido butanoico
5	Étil éster de ácido hexanoico
6	Metil éster de ácido butanoico
7	Metil éster de ácido hexanoico
8	Fenilmetil éster de ácido acético
9	Metil éster de ácido octanoico
10	Octil ester de ácido butanoico
11	Etano-1,1-diol dibutanoato
12	(Z)-3-Hexen-1-ol acetato
13	Linalol
14	±-Trans-Nerolidol

La Figura 21 muestra los principales grupos de compuestos identificados para las cuatro muestras de fresas, hay que destacar que la mayoría de los compuestos son ésteres, estos resultados son razonables ya que de acuerdo a investigaciones anteriores sobre compuestos volátiles en fresas han mostrado que una larga lista de ésteres contribuyen al aroma de las fresas, donde han sido usadas diferentes técnicas para el estudio de fracciones volátiles en diferentes variedades de fresas, en los últimos 30 años se han identificado mas de 360 compuestos volátiles en diferentes variedades de fresa⁵³⁻⁵⁷.

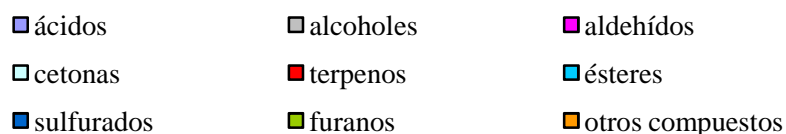
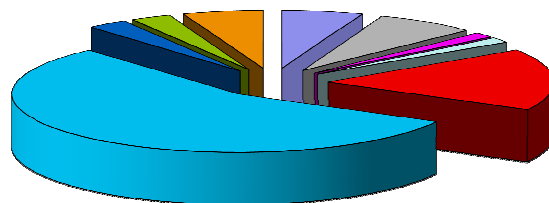


Figura 21. Principales grupos de compuestos predominando los ésteres como el grupo principal.

Sin embargo, a pesar de que varios compuestos han sido identificados y cuantificados en diferentes estudios no todos identifican exactamente los mismos compuestos; su presencia y concentración se ve alterada debido a varios factores como son la especie o variedad de fresa⁵⁸; además hay que tomar en cuenta que la fresa es un fruto no climatérico que usualmente le toma alrededor de 30 días para lograr su tamaño de maduración.

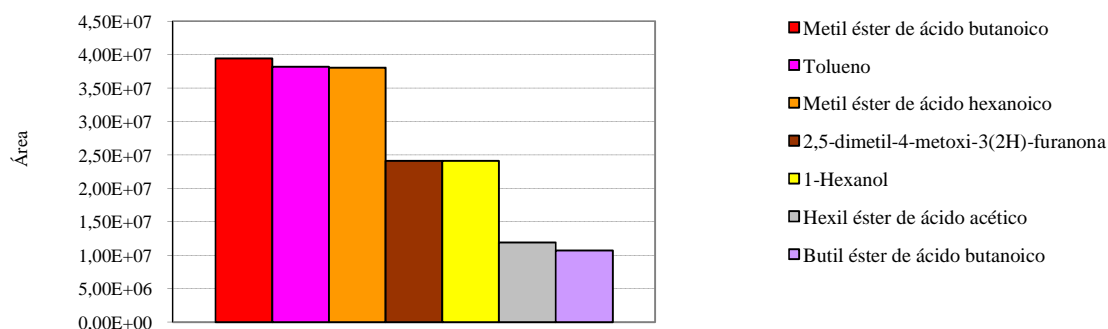


Figura 22. Compuestos mayoritarios de la muestra 1.

Este tiempo es altamente dependiente de factores como son la luz, temperatura, composición del suelo y otras condiciones de cultivo⁵⁹, así como la etapa de maduración es también un factor importante ya que mientras esta avanza, varios componentes se degradan, mientras que otros son formados al paso del tiempo.

En estos casos la degradación permite el deterioro del aroma original del producto, permitiendo la formación de volátiles propios de la fermentación de la fresa como lo pueden ser acetaldehído⁶⁰, etanol¹⁸, y acetato de etilo¹⁸.

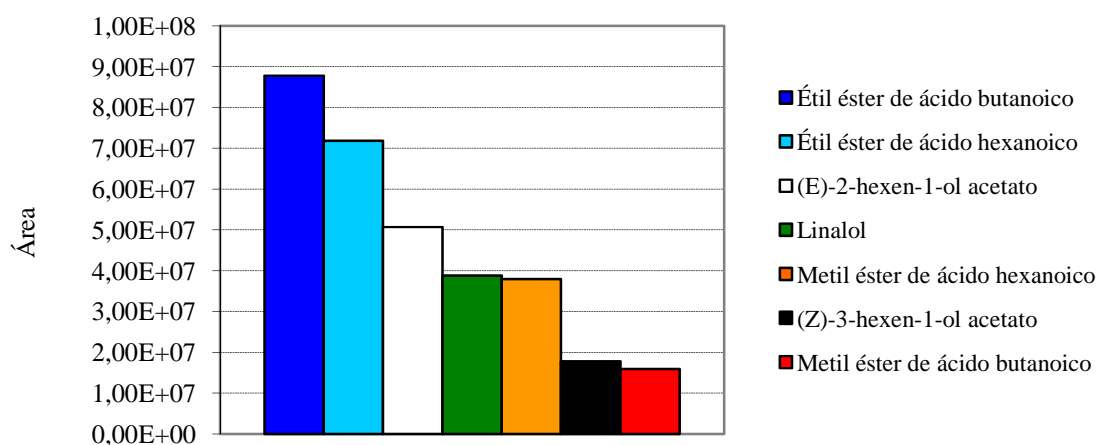


Figura 23. Compuestos mayoritarios de la muestra 2.

Así pues se puede decir que son varios los factores que influyen para que no siempre se encuentren los mismos componentes volátiles; la naturaleza y la composición de un aroma asociado con una variedad definida dependerá de las condiciones agronómicas y climáticas, ya que serán diferentes de una temporada a otra, e incluso al variar el momento de la cosecha en una misma temporada. Así como también los métodos de extracción y preparación de la muestra.

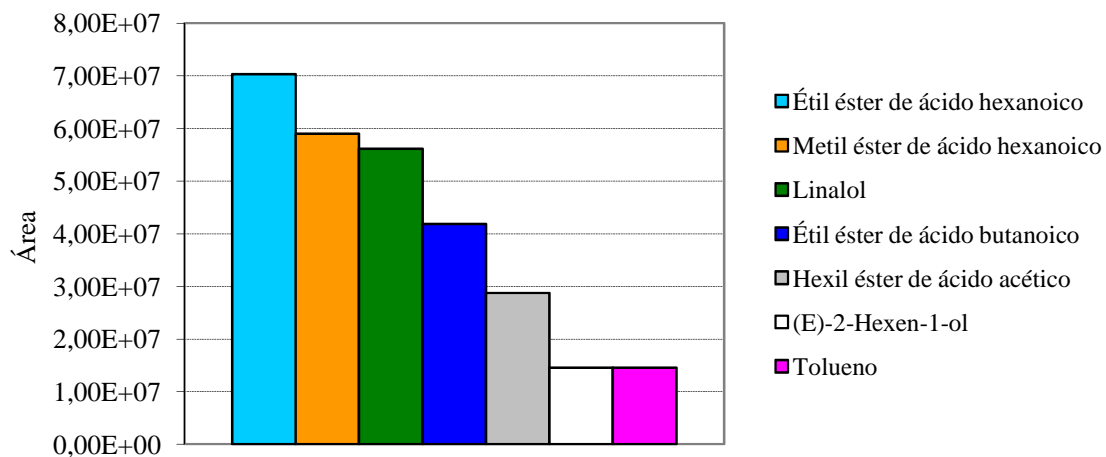


Figura 24. Compuestos mayoritarios de la muestra 3.

Varios autores difieren en los compuestos más representativos del aroma en las fresas. Por ejemplo; de acuerdo a Zabetakis⁴ el cual recopiló de diversos trabajos los compuestos extraídos de fresas mediante diferentes técnicas, hay una serie de ésteres representativos del aroma de las fresas, estos son metil éster de ácido butanoico (metil butanoato), etil éster de ácido butanoico (etil butanoato) y el etil éster de ácido hexanoico (etil hexanoato). En este trabajo estos tres compuestos fueron identificados como mayoritarios en todas las muestras analizadas (Figuras 22-25), aunque otros autores no han descrito estos compuestos⁶⁰.

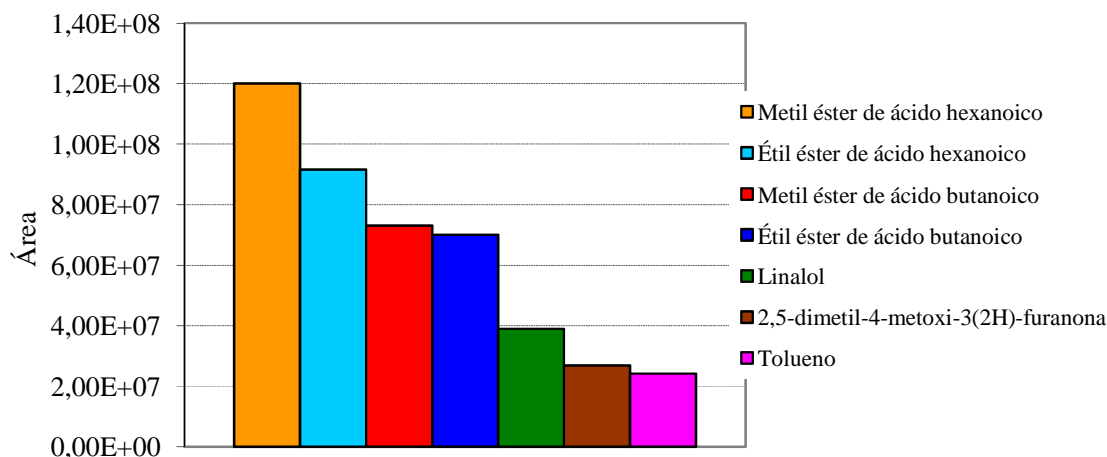


Figura 25. Los siete compuestos mayoritarios de la muestra 4.

Además de los ésteres hay otros compuestos que se reportan como característicos del aroma de las fresas, Larsen⁶¹ considera que debido a su alta concentración, el etil hexanoato junto con linalol y 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furan-3-ona (DMHF o también llamado Furaneol) son los componentes mas importantes en lo que se refiere a la contribución de su aroma. Este último junto con el 2,5-dimetil-4-metoxi- 3(2H)-furanona (Mesifuran), son considerados como los mayores contribuyentes al aroma de las fresas^{1-4, 63}. El olor de esta furanona (DMHF) ha sido descrita como caramelo, dulce y afrutado tipo piña. En soluciones diluidas exhibe el sabor típico de fresas frescas. Este compuesto fue descubierto en las piñas, y posteriormente identificado en fresas, frambuesas, mangos, tomates y otras frutas^{61, 63}.

La detección y recuperación del DMHF se ven afectados por las condiciones de aislamiento y métodos de detección. En los resultados de este trabajo no se identificó en ninguna de las muestras examinadas, esto se debe a la naturaleza del compuesto, ya que se trata de un compuesto termolábil y aunque puede adsorberse en la fibra PDMS/DVB, al introducir la

fibra por el puerto de inyección del cromatógrafo de gases que esta a una temperatura de 250°C este se descompone y no fue posible detectarlo.

En la composición de volátiles en fresas se han identificado derivados del DMHF^{2,4,61-63}, que también están presentes como compuestos volátiles, estos son: 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furan-3-ona-glucosido (DMHF glucosido), 2,5-dimetil-4-metoxi-2H-furan-3-ona (mesifuran) y 2,5-dimetil-4-hidroxi-2H-furan-3-ona-6'-O-malonil-glucosido. De estos tres compuestos solo el Mesifuran fue encontrado en este estudio, aunque solo en las muestras 1 y 2. Asimismo se encontró el compuesto 5-hexildihidro-2(3H)-furanona que debido a su estructura también podría ser un derivado del DMHF.

A pesar del gran valor comercial y su importancia como saborizante, ya que es usado en la industria en muchos productos manufacturados sabor fresa, la biosíntesis del DMHF es desconocida^{61,63}. Algunas investigaciones⁶³ se enfocan en investigar bacterias como *Methylobacterium extorquens* y células de fresa a fin de destacar el papel de las bacterias en la síntesis de DMHF, aunque se piensa en una degradación enzimática de azúcares como D-glucosa y D-fructosa como la ruta mas probable de formación natural de estos compuestos. Esto puede dar pie a posibles aplicaciones en el campo de la biotecnología para la producción de DMHF, ya que la mayoría de los sabores artificiales que se producen son producidos vía síntesis química.

El linalol es otro de los compuestos importantes en el aroma de las fresas, este terpeno de esencia floral es considerado como contribuyente al aroma fresco de las fresas⁶⁴. De todos los terpenos identificados, el linalol es por mucho el que se encuentra en mayor

concentración (Figura 26). Este compuesto no es exclusivo de la planta de fresa ni de su fruto ya que se encuentra en diferentes plantas.

Linalol y nerolidol son los únicos terpenos que se identificaron en todas las muestras, Attaway et al^{65, 66} sugieren que algunos terpenos como el nerolidol, limoneno, α -terpineol y terpinen-4-ol, (Otros terpenos como α -pineno, β -pineno, mirceno y ocimeno también se mencionan, pero estos últimos no fueron detectados en el presente trabajo) pueden derivarse del linalol o teniendo a este como intermediario. Aunque 4-terpineol y α -terpineol, han sido producidos por la oxidación del limoneno^{67, 68}.

El nerolidol es un sesquiterpeno acíclico, mencionado como de los de mayor relevancia; se encuentra como componente de muchos aceites esenciales y es usado como base de muchas fragancias de tipo floral. Este sesquiterpeno se menciona como poseedor de propiedades antibacteriales, antifúngicas y antiparasitarias^{69, 70}, aunque no es el único compuesto mencionado con estas propiedades, ya que son varios los compuestos volátiles presentes en la fresa que han sido descritos con estas propiedades, como: 2-nonanona y (Z)-3-hexen-1-ol, 1-octanol, 1-hexanol, (E)-2-hexenil éster de ácido butanoico, (E)-2-hexenal y (E)-2-hexen-1-ol (este último se menciona como un producto derivado del (E)-2-hexenal)^{16, 71, 72}.

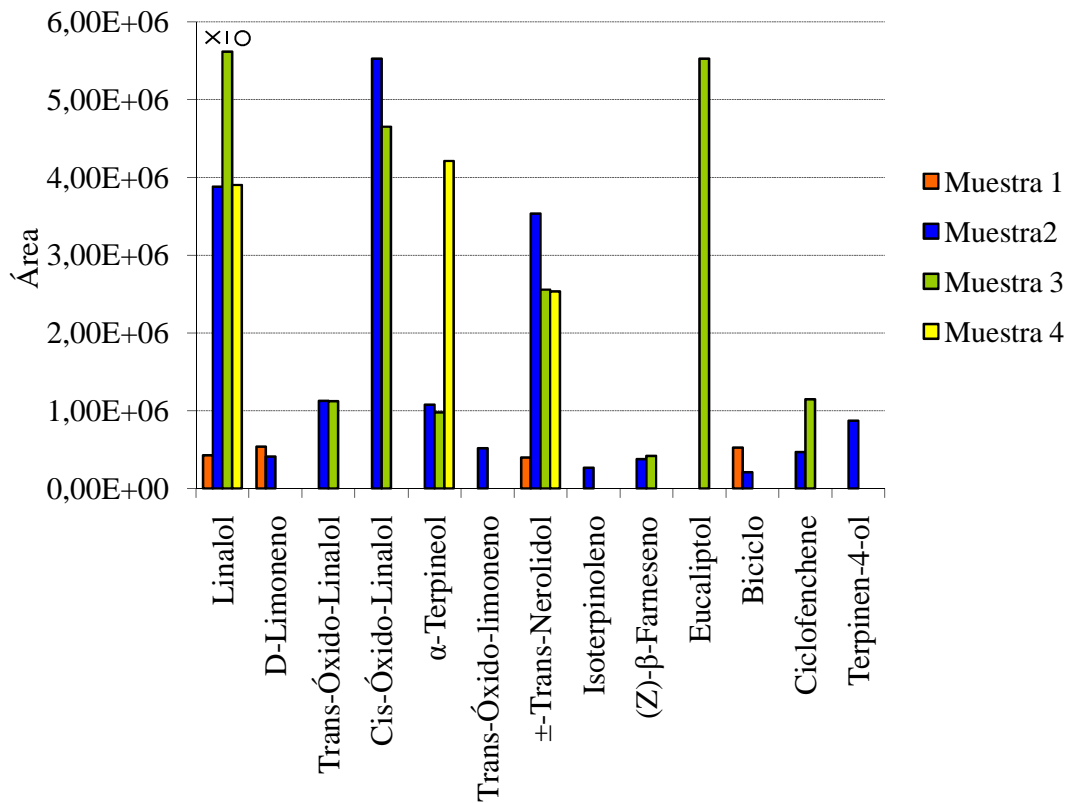


Figura 26. Terpenos identificados en las cuatro muestras.

Como cualquier fruta, las fresas presentan una microbiota inicial, la cual según su naturaleza y cantidad puede implicar una prolongación mayor o menor de su vida útil. Los hongos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cactorum* se presentan como los principales hongos que atacan el cultivo de fresa^{18, 72}.

La mayoría de los frutos recién recolectados son resistentes a contaminaciones fúngicas, pero durante su maduración y senescencia se vuelven más susceptibles a infecciones. Esto es porque el hongo permanece en su estado latente hasta alcanzar las condiciones

atmosféricas adecuadas para generar esporas y poder desarrollarse cuando el fruto alcanza su madurez, puesto que el mayor grado de deterioro facilita su infección y expansión.

Normalmente para evitar el desarrollo antifúngico, se toman una serie de medidas como el almacenamiento a bajas temperaturas y las atmósferas modificadas, pero pocas investigaciones se han realizado para probar la eficacia de compuestos volátiles propios del aroma de la fresa con capacidad antifúngica. Esta interesante propiedad puede ser estudiada tomando como referencia los compuestos volátiles identificados y verificar si alguno cumple con los requerimientos de baja toxicidad, bajo costo, efectividad ante el desarrollo de hongos y que no modifique las características del fruto. Así pues alguno de estos compuestos volátiles propios del aroma de las fresas podría ser usado como fungicida o como preventivo al desarrollo de hongos.

Otros grupos de compuestos volátiles que también fueron identificados como el caso de los alcoholes, aunque los alcoholes tienen propiedades importantes son pocos los que se han identificado y no contribuyen significativamente al olor de las fresas, con excepción del linalol, que aunque se clasificó como terpeno, también puede ser visto como un monoterpeno alcohólico. Este está presente en grandes cantidades en algunas variedades y posee un intenso y agradable olor herbal. Otros compuestos como el hexenal, 2-hexenal, cis-3-hexen-1-ol, octanal, nonanal y trans 2- octenal también son responsables de notas herbales en la fresa aunque no se encuentra presente en grandes cantidades. Los ácidos generalmente tienen valores bajos de umbral, y tienen un pequeño impacto en el olor de las fresas.

Como se ha mencionado el presente estudio tiene por objetivo principal determinar los compuestos volátiles y semivolátiles encontrados en diferentes muestras de fresas usando

MEFS-CG-EM. Esto permitirá la posibilidad de conocer cuales son los componentes que contribuyen al aroma de las fresas, además de proponer las condiciones para una mejor extracción de estos.

Esta técnica también pudiera aplicarse para otros fines ya que es bien conocido que muchas bacterias emiten compuestos volátiles durante su desarrollo y por lo tanto se puede considerar conveniente examinar los compuestos producidos por patógenos. *Escherichia coli* O157:H7 es un buen ejemplo de patógenos que pueden desarrollarse en la fresa, este microorganismo representa una amenaza potencial para la salud humana, ya que su ácido-tolerancia le permite moverse dentro alimentos derivados de plantas. El peligro se deriva debido a que es una de las frutas más consumidas en países desarrollados y por lo general se comen crudas. Entonces pudieran examinarse alimentos donde pudiera desarrollarse esta bacteria, producir su crecimiento y detectar si el microorganismo emite compuestos volátiles.

5.4 Adición de desinfectante

Debido a la necesidad de desinfectar las frutas y verduras que van a ser consumidas en fresco es necesario el uso de desinfectantes, aunque ante el uso de estos se ha notado pérdidas en sus propiedades sensoriales. Se realizó el estudio de una muestra de fresa sin sanitizante para identificar los compuestos extraídos (Figura 27).

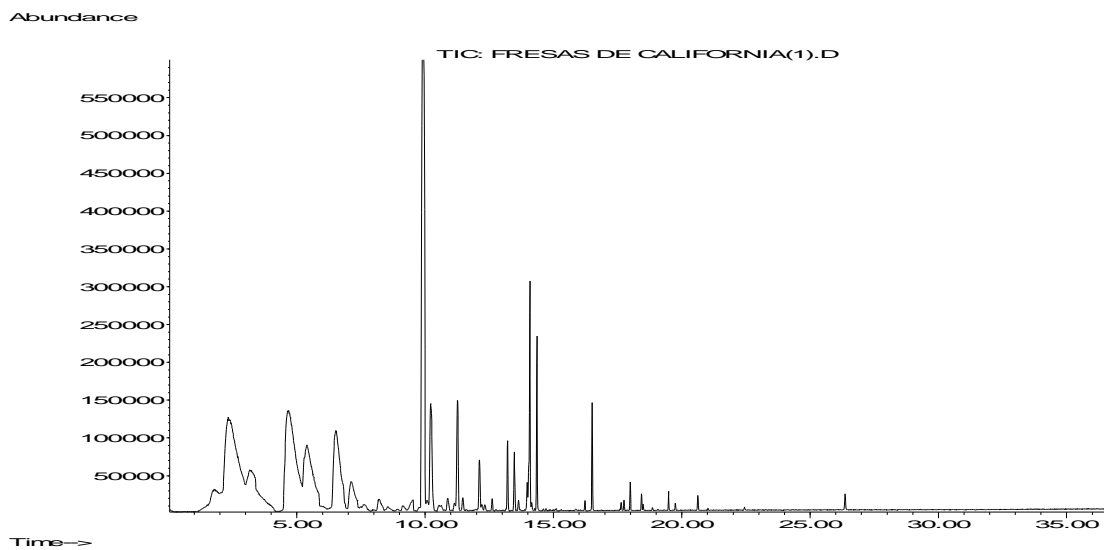


Figura 27. Cromatograma correspondiente a los compuestos extraídos por MEFS bajo las condiciones óptimas señaladas anteriormente. Las fresas utilizadas son las correspondientes a la muestra 1 provenientes de California.

Posteriormente con el mismo tipo de muestra se siguió el procedimiento indicado por los fabricantes de Microdyn para la desinfección de estas y se procedió a estrujar, extraer el jugo, realizar el proceso de extracción e identificación de volátiles y semivolátiles por MEFS-CG-EM. Obteniéndose los cromatogramas correspondientes (Figura 28).

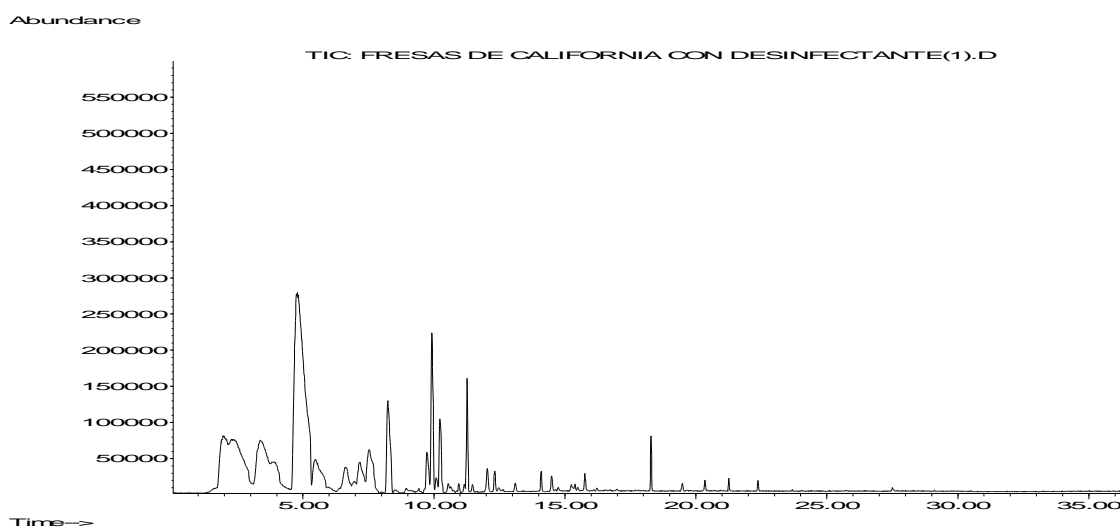


Figura 28. Cromatograma correspondiente a los compuestos extraídos por MEFS bajo las condiciones óptimas señaladas anteriormente. Las fresas utilizadas son las correspondientes a la muestra 1.

Al comparar ambos cromatogramas a simple vista (figuras 26 y 27) parecería que los compuestos extraídos en las fresas desinfectadas son diferentes a los de la muestra sin desinfectar, pero el análisis realizado a los picos de ambos cromatogramas utilizando el programa del equipo de espectrometría de masas reveló que se obtienen los mismos compuestos en ambos casos. La Tabla 11 muestra el total de compuestos encontrados en ambas muestras.

Tabla 11. Total de compuestos extraídos con y sin adición de desinfectante.

Compuestos			
1	Ácido 2-metil-butanoico	24	Metil éster de ácido butanoico
2	Ácido hexanoico	25	Metil éster de ácido hexanoico
3	Ácido 2-metil-hexanoico	26	Fenilmetil éster de ácido acético
4	Hexanol	27	Metil éster de ácido octanoico
5	3-Metil-1-pentanol	28	Butil éster de ácido acético
6	Octanol	29	(E)-2-Hexen-1-ol acetato
7	Nonanol	30	(Z)-3-Hexen-1-ol acetato
8	E-11,13-Tetradecadien-1-ol	31	Butil éster de ácido butanoico
9	Nonanal	32	Hexil éster de ácido acético
10	2-Octanona	33	Hexil éster de ácido butanoico
11	2-Nonanona	34	Octil éster de ácido acético
12	2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanon	35	2-Propen-1-ol,3-fenil acetato
13	Étil éster de ácido butanoico	36	Octil ester de ácido butanoico
14	1-Metil etil éster de ácido butanoico	37	Etano-1,1-diol dibutanoato
15	Étil éster de ácido pentanoico	38	Ciclofenchene
16	1-Metil etil éster de ácido butanoico	39	D-Limoneno
17	3-Metil etil éster de ácido butanoico	40	Isoterpinoleno
18	Étil éster de ácido 2-hexenoico	41	Biciclo hept-4-en-3-ol, 3,7,7-trimetil
19	Étil éster de ácido hexanoico	42	Linalol
20	Étil éster de ácido benzoico	43	α -Muroleno
21	1-Metiletil éster de ácido hexanoico	44	\pm -Trans-Nerolidol
22	Étil éster de ácido octanoico	45	Diclorometano
23	Étil éster de ácido decanoico	46	Tolueno

Los picos obtenidos en el cromatograma correspondiente a las fresas desinfectadas (Figura 28) son todos más pequeños que los de la muestra sin desinfectante. Lo pensado es que el

fruto absorbió agua, obteniéndose un jugo mas diluido aunque también pudiera ser que parte de los compuestos se hayan quedado en el agua de remojo.

Lo que dejo claro el análisis en el EM es que la adición del desinfectante no altera la composición por lo menos en lo que se refiere a volátiles y semivolátiles, aunque el área de los picos resulta ser menor.

5.5 Análisis cuantitativo

De los compuestos identificados en las diferentes muestras en estudio se procedió a cuantificar los compuestos mayoritarios; los cuales se identificaron en todas las muestras.

Los compuestos mayoritarios fueron 2 Terpenos y 2 Esteres: Linalol, Nerolidol, Étil éster de ácido hexanoico y Metil éster de ácido hexanoico.

Tabla 12. Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los compuestos mayoritarios en fresas (n=3).

	Muestra	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% C.V
Linalol	1	19.6 ± 1.40	7.13
	2	152 ± 10.5	6.86
	3	281 ± 15.6	5.56
	4	216 ± 13.0	6.20
Nerolidol	1	2.65 ± 0.225	8.49
	2	13.1 ± 0.721	5.51
	3	22.8 ± 0.704	3.09
	4	20.6 ± 0.548	2.66
Étil éster de ácido hexanoico	1	6.02 ± 0.356	5.91
	2	247 ± 23.6	9.54
	3	245 ± 23.2	9.48
	4	313 ± 14.7	4.69
Metil éster de ácido hexanoico	1	135 ± 2.65	1.96
	2	238 ± 1.16	0.48
	3	192 ± 1.16	0.60
	4	671 ± 13.6	2.02

5.5.1 Linealidad del método

Para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales en la recta de calibración, se evaluó la linealidad del método para los cuatro compuestos cuantificados. Debido a la diferencia en concentración que se encontraron en las muestras en el caso del Linalol y Étil éster de ácido hexanoico se realizaron dos rectas de calibración de diferente

intervalo de concentración. Para Nerolidol y Metil éster de ácido hexanoico se realizó solo una curva de calibración.

Los intervalos de concentración se muestran en la Tabla 13 así como los coeficientes de correlación correspondientes que en todos los casos se obtuvo una $r^2 > 0.9900$ (ver rectas de calibración en el Anexo), lo cual indica que existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración.

Tabla 13. Linealidad del método para los compuestos cuantificados (n=3).

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	Pendiente	Intercepto
Linalol	10 - 90	0.9989	229405	-847077
	100 - 500	0.9996	132460	5315767
Nerolidol	1 - 35	0.9934	104386	-192445
Étil éster de ácido hexanoico	1 - 9	0.9997	141182	42790
	50 - 450	0.9915	26645	1342978
Metil éster de ácido hexanoico	50 - 800	0.9925	152929	16693318

La Tabla 13 muestra que para todos los compuestos se obtuvo satisfactoriamente una respuesta lineal dentro de los intervalos de concentración señalados para el total de rectas de calibración.

5.5.2 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron mediante la recta de regresión para la calibración en cada compuesto. Se obtuvo la desviación estándar (DE) de

la concentración más pequeña de cada recta para cada compuesto y con estos datos se calculó el LD (3 DE) y LC (10DE).

Tabla 14. Límites de detección y cuantificación. (n=3)

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% CV ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Linalol	10 ± 0.555	6.82	1.67	5.55
Nerolidol	1.0 ± 0.0115	0.525	0.0345	0.115
Étil éster de ácido hexanoico	1.0 ± 0.0881	7.16	0.264	0.881
Metil éster de ácido hexanoico	50 ± 6.76	6.05	20.3	67.6

5.5.3 Cuantificación de compuestos mayoritarios

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la cuantificación de los compuestos mayoritarios de las muestras en estudio. La cuantificación se realizó por triplicado para cada muestra obteniéndose un %CV < 10 en todos los casos.

Estos resultados muestran que el Linalol fue el terpeno mayoritario en todas las muestras en estudio y que la muestra 3 contiene la mayor concentración de los dos terpenos cuantificados. Con respecto a los ésteres la muestra 4 presentó la mayor concentración tanto del Metil éster de ácido hexanoico como del Étil éster de ácido hexanoico.

De las 4 muestras de diferentes fresas que se analizaron, la muestra 1 se percibió menos aromática que las otras muestras; coincidiendo con que es la más baja en concentración de los compuestos mayoritarios. Por otro lado la muestra 3 se identificó como la más aromática y coincide que es la que mayor concentración de terpenos contiene. Probablemente la concentración de terpenos influye significativamente en el aroma; sin embargo, para poder asegurar esto se tendría que realizar pruebas sensoriales con los compuestos mayoritarios y un estudio más extenso que incluyera fresas de otras regiones y controlar otras variables.

6 CONCLUSIONES

Se desarrolló un método por microextracción en fase sólida seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de compuestos volátiles y semivolátiles en cuatro diferentes muestras de fresa procedentes de diferentes lugares.

La MEFSe es una técnica analítica eficiente, directa, no tan costosa y que no requiere el uso de disolventes para extraer rápidamente los componentes químicos volátiles de las variedades de fresa.

Se identificaron un total de 77 compuestos volátiles, entre los que destacan ésteres (34) y terpenos (14). Del total solo 14 se presentaron como comunes en todas las muestras, tratándose estos de 1 ácido, 2 terpenos, 10 ésteres y 1 furanona. Debido a estos se puede decir que el perfil de compuestos volátiles es diferente para cada muestra. Aunque puede mencionarse a los siguientes compuestos como los principales componentes del aroma entre las fresas analizadas: linalol, etil éster de ácido butanoico, etil éster de ácido hexanoico, metil éster de ácido butanoico, metil éster de ácido hexanoico y 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona por ser los componentes mayoritarios y encontrarse en todas las muestras.

El análisis en el EM demuestra que la adición del desinfectante no altera la composición de componentes volátiles y semivolátiles, aunque el área de los picos resulta ser menor.

Con respecto a la cuantificación la muestra 3 presentó mayor concentración de linalol y nerolidol siendo las concentraciones 281 ± 15.6 y $22.8 \pm 0.704 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, mientras que la muestra 4 presentó mayor concentración de etil éster de ácido hexanoico y metil éster de ácido hexanoico obteniéndose 313 ± 14.7 y $671 \pm 13.6 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

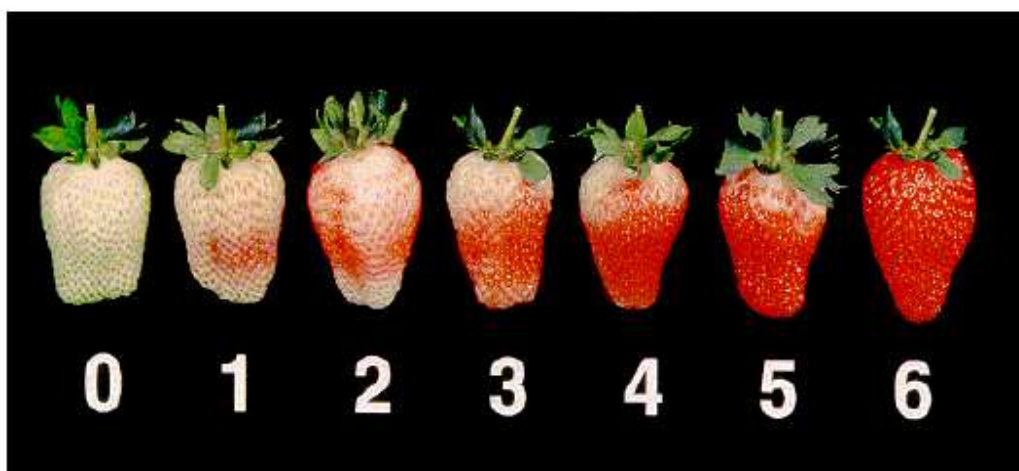
La linealidad del método fue buena ya que presenta valores superiores a $r^2 < 0.9915$. La precisión del método también fue buena ya que presentó valores de coeficiente de variación menores al 10%.

7 ANEXO

TABLA A1.- Especificaciones de tamaño

Tamaño	Intervalo de diámetro ecuatorial (cm)		
		De	Mayor
A	3.2	a	3.1
B	2.6	a	2.6
C	2.0	a	1.9
D	1.6		

TABLA A2.- Descripción de los diferentes estados de maduración de la fresa a través de los colores



Las figuras A1-A6 muestran las curvas de calibración absoluta para la cuantificación de compuestos mayoritarios.

Figura A1. Curva de calibración absoluta para Linalol y sus intervalos de concentración.

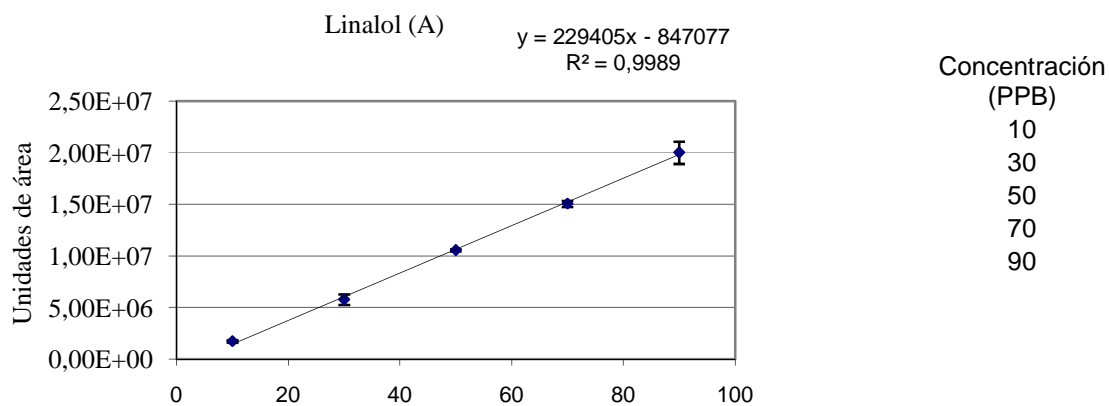


Figura A2. Curva de calibración absoluta para Linalol y sus intervalos de concentración.

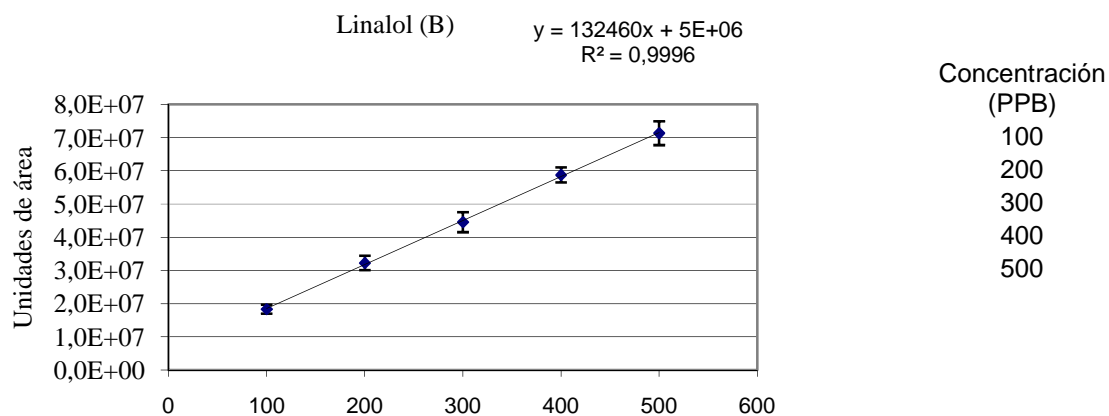


Figura A3. Curva de calibración absoluta para Nerolidol y sus intervalos de concentración.

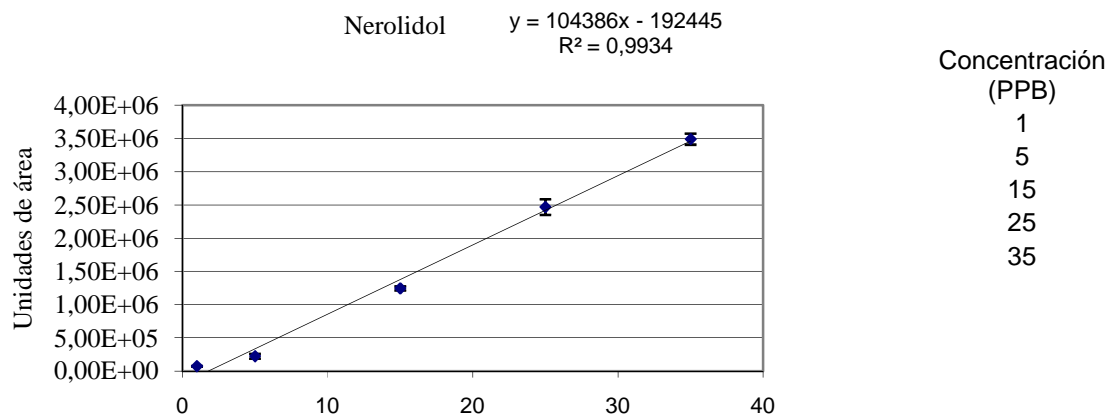


Figura A4. Curva de calibración absoluta para Éster etílico de ácido hexanoico y sus intervalos de concentración.

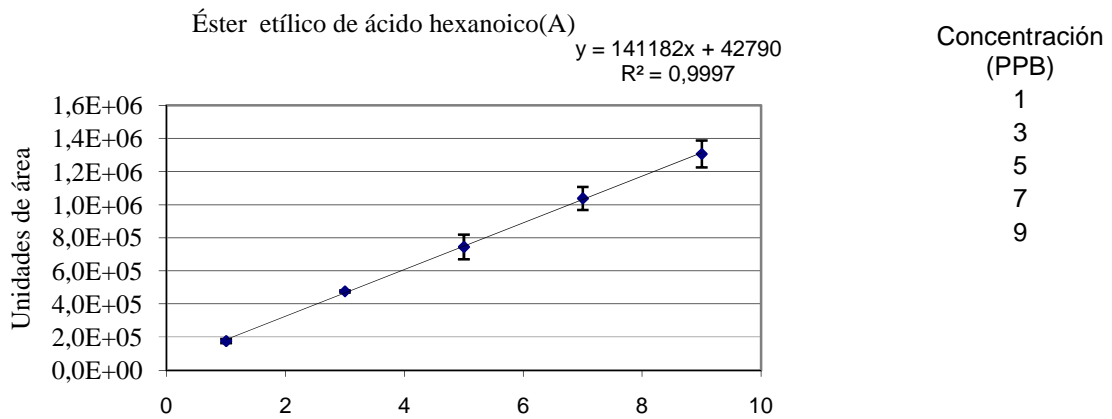


Figura A5. Curva de calibración absoluta para Éster etílico de ácido hexanoico y sus intervalos de concentración.

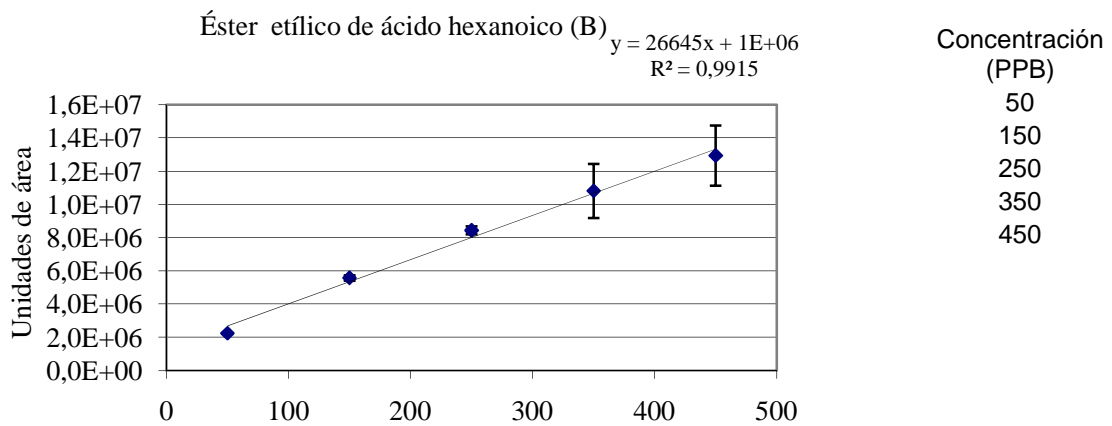


Figura A6. Curva de calibración absoluta para Éster metílico de ácido hexanoico y sus intervalos de concentración.

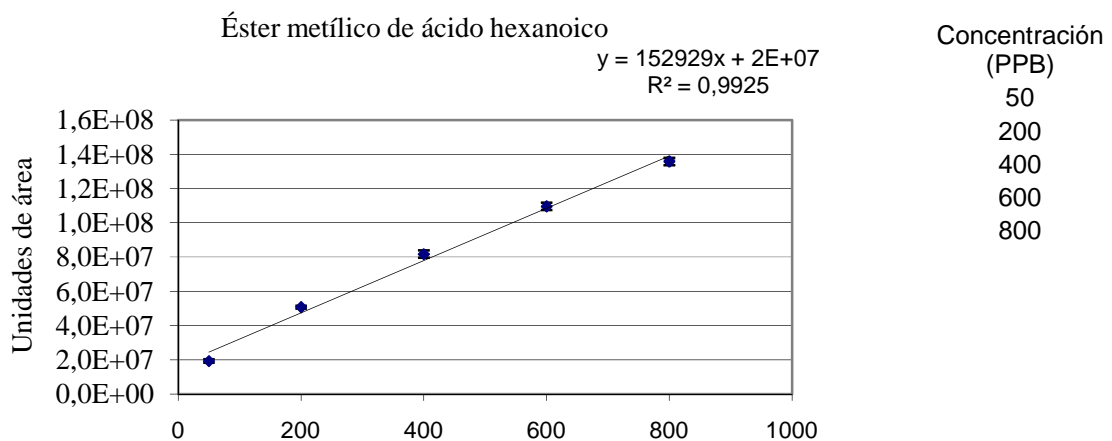
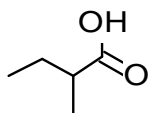


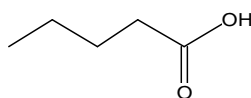
Tabla A3. Estructuras de los compuestos identificados en el presente estudio.

ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

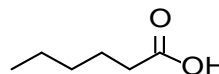
Ácido 2-metil-butanoico



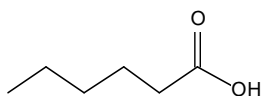
Ácido pentanoico



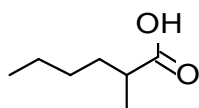
Ácido hexanoico



Ácido heptanoico

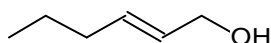


Ácido 2-metil hexanoico

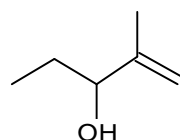


ALCOHOLES

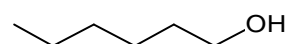
(E)-2-Hexen-1-ol



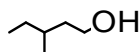
2-Metil-1-Penten-3-ol



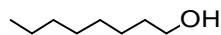
Hexanol



3-Metil-1-pentanol



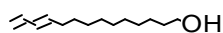
Octanol



Nonanol

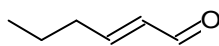


E-11,13-Tetradecadien-1-ol

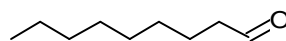


ALDEHÍDOS

(E)-2-Hexenal

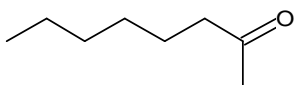


Nonanal

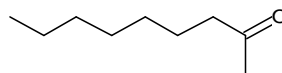


CETONAS

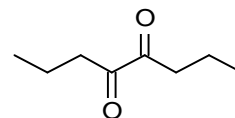
2-Octanona



2-Nonanona

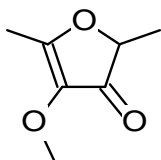


4,5-Octanodiona

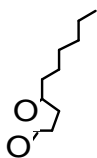


FURANOS

2,5-Dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona

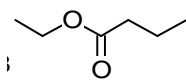


5-Hexildihidro-2(3H)-furanona

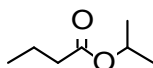


ÉSTERES ETÍLICOS

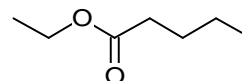
Étil éster de ácido butanoico



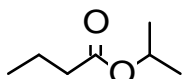
1-Metil etil éster de ácido butanoico



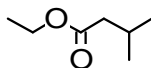
Étil éster de ácido pentanoico



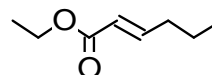
1-Metil etil éster de ácido butanoico



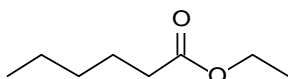
3-Metil etil éster de ácido butanoico



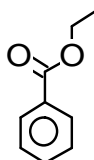
Étil éster de ácido 2-hexenoico



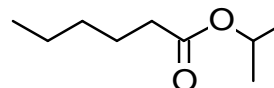
Étil éster de ácido hexanoico



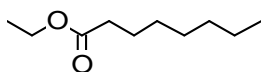
Étil éster de ácido benzoico



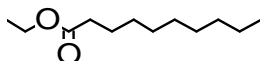
1-Metil etil éster de ácido hexanoico



Étil éster de ácido octanoico

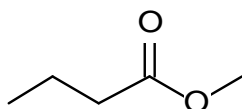


Étil éster de ácido decanoico

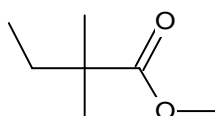


ÉSTERES METÍLICOS

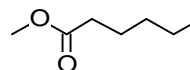
Metil éster de ácido butanoico



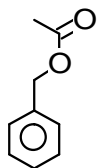
2,2-Dimetil metil ester ácido butanoico



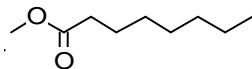
Metil éster de ácido hexanoico



Fenilmetil éster de ácido acético

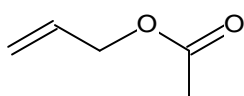


Metil éster de ácido octanoico

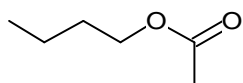


OTROS ÉSTERES

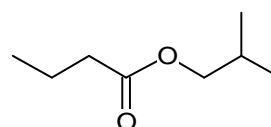
2-Propenil éster de ácido acético



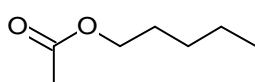
Butil éster de ácido acético



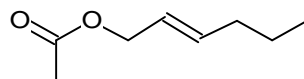
2-Metilpropil éster de ácido butanoico



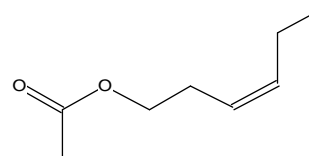
Pentil éster de ácido acético



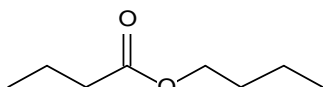
(E)-2-hexen-1-ol acetato



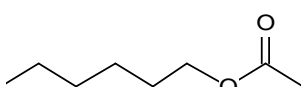
(Z)-3-hexen-1-ol acetato



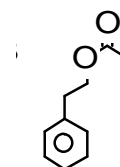
Butil éster de ácido butanoico



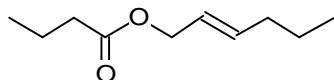
Hexil éster de ácido acético



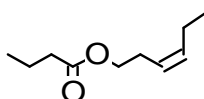
2-Feniletil éster de ácido acético



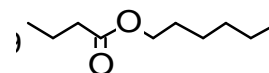
(E)-2-Hexenil éster de ácido butanoico



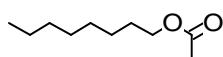
(Z)-3-Hexenil éster de ácido butanoico



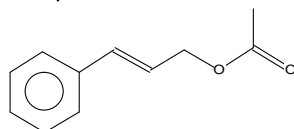
Hexil éster de ácido butanoico



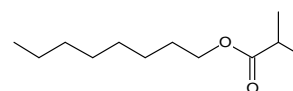
Octil éster de ácido acético



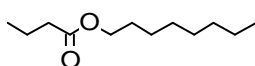
2-Propen-1-ol, 3-fenil acetato



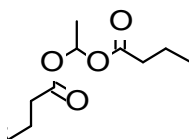
2-Metil-octil éster de ácido propanoico



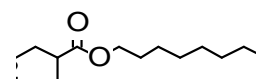
Octil ester de ácido butanoico



Etano-1,1-diol dibutanoato

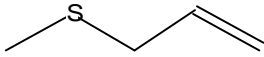


2-Metil-octil éster de ácido butanoico

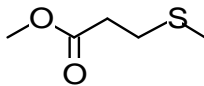


SULFURADOS

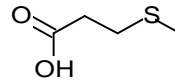
Metiltio-2-propeno



3(Metilito) metil éster de ácido propanoico

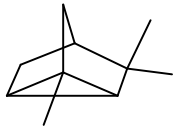


3(Metilito) ácido propanoico

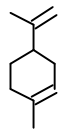


TERPENOS

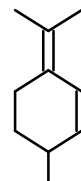
Ciclofenchene



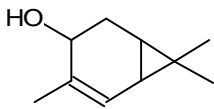
D-Limoneno



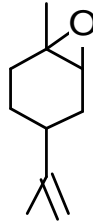
Isoterpinoleno



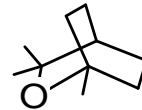
Biciclo hept-4-en-3-ol, 3,7,7-trimetil



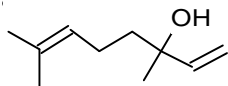
Trans-Óxido- limoneno



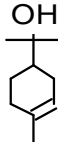
Eucaliptol



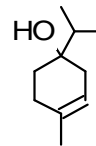
Linalol



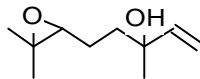
α -Terpineol



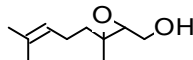
Terpinen-4-ol



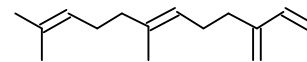
Cis Óxido- - Linalol



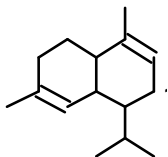
Trans- Óxido- Linalol



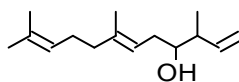
(Z)- β -Farneseno



α -Muroleno

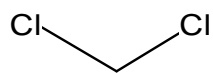


\pm -Trans-Nerolidol

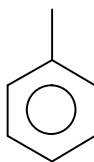


OTROS COMPUESTOS

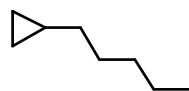
Diclorometano



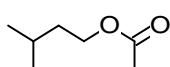
Tolueno



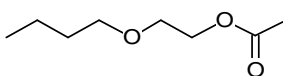
Ciclopropano pentil



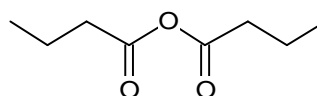
1-Butanal, 3-metil acetato



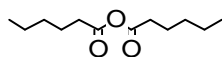
2-Butoxi-etil acetato



Ácido butanoico anhido



Ácido hexanoico anhido



REFERENCIAS

1. Meänager I; Jost M; Aubert C. Changes in Physicochemical Characteristics and Volatile Constituents of Strawberry (*Cv. Cigaline*) during Maturation. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 1248-1254.
2. Latrasse, A. *Fruits III. In Volatile Compounds in Foods and Beverages*. Editorial; Dekker: New York, 1991; pp 329- 387.
3. Schieberle, P.; Hofmann, T. Evaluation of the character impact odorants in fresh strawberry juice by quantitative measurements and sensory studies on model mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 227-232.
4. Zabetakis, I.; Holden, M. A. Strawberry flavour: Analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 74, 421-434.
5. Macias, L; Quero, E; Loa, M. Carbohydrate Differences in Strawberry Crowns and Fruit (*Fragaria x ananassa*) during Plant Development. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3317-3321.
6. Coordinación General de Comunicación Social. Crece 400 por ciento la producción de Fresa en México, en línea 18 de enero de 2009, disponible: www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2009/enero/B015
7. Coordinación General de Comunicación Social. Logran productores mexicanos de fresa, zarzamora y frambuesa mayor preferencia en consumidores de Asia, Europa y Norteamérica, en línea 27 de agosto de 2008, disponible: www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2008/agosto/B219.
8. Coordinación General de Comunicación Social. México exportó en 2007, 125 mil toneladas de fresa con un valor de 2,100 mdp: sagarpa, en línea 8 de abril 2008, disponible: <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/boletines/2008/abril/B068.pdf>
9. Urruty, L; Giraudel, J-L; Lek, S; Roudeillac, P; Montury, M. Assessment of Strawberry Aroma through SPME/GC and ANN Methods. Classification and Discrimination of Varieties. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3129-3136.
10. De Boishebert, V; L, Urruty; J.L, Giraudel; M, Montury. Assessment of Strawberry Aroma through Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography and Artificial Neuron Network Methods. Variety Classification versus Growing Years. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 149-155.
11. Perez, J.L. *Cultivo de fresas*. Editorial; Acribia: Madrid 1979; pp 13-41.

-
12. Brooklin. *Cultivo de frutas en la huerta*. Editorial; Trillas: España Enero 2001. pp 54-55.
 13. Darrow, G.M). *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*. Editorial; Holt, Rinehart and Winston: New York 1996, disponible:
<http://www.nalusda.gov/pgdic/Strawberry/darpubs.htm>
 14. Pérez, K.C; Ramos, K. Efecto de la aplicación de un recubrimiento comestible a base de gelatina en la calidad de fresa (*Fragaria vesca*) almacenada en refrigeración. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2006.
 15. Robertson K.R. The Genera of *Rosaceae* in the southeastern United States. *J Arnold Arboretum*. 1994, 55, 600-609.
 16. García, F.J. en línea 2003, disponible
www.euita.upv.es/.../Web_Frutos/Estructura.htm
 17. Bourges, R.H. *Recomendaciones de Ingestión de Nutrientes para la Población Mexicana; bases fisiológicas*. Editorial; Médica Panamericana: México 2005; pp 18.
 18. Almenar, Eva. Envasado activo de fresas silvestres. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. España, 2005.
 19. Wils, R. Mc Glasson, B. Graham, D. Daryl, J. *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales*. Editorial; Acribia: Zaragoza España 2003; pp 18-19.
 20. Rosen, J.C.; Kader, A.A. Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *Journal Food Science*. 1989, 54, 656-659.
 21. Mason, D.T.; Jarvis, W.R. Postharvest ripening of strawberries. *Horticultural Research*. 1970,10, 125-132.
 22. Olías, J. M. *Tecnología post-cosecha en el sector fretero de Huelva. Departamento de Fisiología y Tecnología de productos vegetales*. Instituto de la Grasa. C.S.I.C. Sevilla 1998; pp 27.
 23. Osborne, D.R. *Análisis de los componentes de los alimentos*. Editorial; Acribia: Zaragoza. España,1993; 258 pp.
 24. Rosen, J.C.; Kader, A.A. Postharvest physiology and quality maintenance of sliced pear and strawberry fruits. *Journal Food Science*. 1989, 54, 656-659.
 25. Mason, D.T.; Jarvis, W.R. Postharvest ripening of strawberries. *Horticultural Research*. 1970, 10, 125-132.

-
26. Jacobs, M.B. *Chemical preservatives. The chemistry and technology of food and food products*. Editorial; Mc Graw-Hill: Ney York 1951 ; pp 42.
27. William, C:F. *Food microbiology*. Editorial; Mc Graw-Hill: Ney York 1958 ;pp 132-136.
28. Instituto de la salud publica de la universidad veracruzana. *Plata colidal: Sus repercusiones en la salud*
29. Saskia, M; Van Ruth, A; Johannes, B; Leire, C. Volatile flavour retention in food technology and during consumption: Juice and custard examples. *Food Chemistry*. 2007, 104, 1654–1661.
30. Santonico, A; Pitita, B; Pennazza, G; Martinellia, M.. Study of the aroma of artificially flavoured custards by chemical sensor array fingerprinting. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008, 133, 345-351.
31. Ke, D.; Zhou, L.; Kader, A.A. Mode of oxygen and carbon dioxide action on strawberry ester biosynthesis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1994, 119, 971-975.
32. Boishebert, V; Giraudel J.L; Montura M. Characterization of strawberry varieties by SPME–GC–MS and Kohonen self-organizing map. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2006, 80, 13-23.
33. Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*. Editorial; Wiley-VCH: Ontario 1997; pp 15-139.
34. Da Silva, A; Augusto, F; Poppi, R.J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-CG. *Food Chemistry*. 2008, 111, 1057–1063.
35. Peñalver, A. Aplicación De La Microextracción En Fase Sólida Al Análisis Medioambiental. Tesis Doctoral. Universidad de ROVIRA I VIRGILI. España, 2002.
36. <http://duiblog.arizonaduicenter.com/Headspace%20vial.gif>., recuperado mayo 2009.
37. http://www.labhut.com/images/static_pages/autosamplers/spme_diagram.png, recuperado mayo 2009.
38. Venkat Mani. Supleco. New Extraction Technology for Environmental Analysis. Manuscrito no publicado, pp 16.
39. Ramirez, E. Determinación De Capsaicina Y Dehidrocapsaicina En Alimentos Por Microextracción en Fase Sólida- Extracción Directa-Cromatografía De Gases-Espectroscopia De Masas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma De México. México, 2007.

-
40. Eisert, R; Levsen, K. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1996, 733,143-157.
41. Gou, Y; Eisert, R; Pawliszyn, J. Automated in-tube solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide análisis. *Journal of Chromatography A*. 2000, 873, 137–147.
42. Skoog, D; James, J. *Análisis Instrumental*: Editorial; McGraw-Hill: Madrid, 1994; pp 217-229.
43. Palmer P.T. *Gas Chromatography/Mass Espectrometry*, encyclopedia of analytical Chemistry. Editorial; Dekker: San Francisco, 1991; pp 157.
44. Creel A, Howard F. Prospects for the Analysis of High Molar Mass Polymers Using MALDI Mass Spectrometry. Editorial; Pure and Applied Macromolecular Chemistry Group.Macro Group:Ucrania, 1993; pp 198.
- 45.Gutiérrez,M; Droguet, M; Jiménez, S.N; Miranda, R; Guzmán, S.H; La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intertex*, 2005, N° 128, 39-43.
46. . L. Esteban. *La Espectrometría de masas en imágenes*. Editorial; ACK: Madrid, 1993; pp 261.
47. Vermeir, S; Hertog, A; Vankerschaver, K; Swennen, Nicolai, R B.M; Lammertyn, J. Instrumental based flavour characterisation of banana fruit. *Food Science and Technology*. 2009, 30, 1-9.
48. Berna, A. Z; Geysen, S; Li, S; Verlinden, B. E; Lammertyn, J; Nicolai, B. M. Headspace fingerprint mass spectrometry to characterize strawberry aroma at superatmospheric oxygen condition. *Postharvest Biology and Technology*. 2007, 46, 230–236.
49. Berna, A. Z; Lammertyn, J; Buysens, S; Di Natale, C; Nicolai, B. M. Mapping consumer liking of tomatoes with fast aroma profiling techniques. *Postharvest Biology and Technology*, 2005, 36, 115–127.
50. Terhi, A; Pohjanheimo, A;Sandell, A.B. Headspace volatiles contributing to flavour and consumer likingof wellness beverages.*Food Chemistry*.2009, 115, 843-851.
51. Nazimaha, A.H;_Quekb, S.Y ; Che Manc, Y.B; Abdul, R; Hashimc, D. Analysis of volatile compounds from Malaysian durians(*Durio zibethinus*) using headspace SPME coupled to fast GC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 207, 20, 31–44.

-
52. Holt, R.U. Mechanisms effecting analysis of volatile flavour components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001, 937, 107–114.
53. Honkanen, E.; Hirvi, T. *The flavour of berries*. In *Food Flavours*. Editorial; Elsevier: Amsterdam, 1990; pp 123-133.
54. Douillard, C.; Guichard, E. The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): characterisation of some cultivars and influence of freezing. *J. Sci. Food Agric.* 1990, 50, 517-531.
55. Meänager, I; Jost, M; Aubert, C. Changes in Physicochemical Characteristics and Volatile Constituents of Strawberry (Cv. Cigaline) during Maturation. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 1248-1254.
56. D'Acampora, B; Dugob, P; Dugoa, G; Mondello, L. Gas chromatography–olfactometry in food flavour analysis. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1186, 123–143.
57. Cordenunsi, B.R; Joa, O; Oliveira, R; Do Nascimento, M.I; Genovese, S; Lajolo, F.M. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2581-2586.
58. Gomes da Silva, M. D. R.; Chaves das Neves, H. J. Differentiation of strawberry varieties through Purge-and-Trap HRGC-MS, HRGC-FTIR and Principal Component Analysis. *J. HighResolut. Chromatogr.* 1997, 5, 275-283.
59. Zabetakis, I.; Gramshaw, J.W; Robinson, D.S. 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis—A review. *Food Chemistry*. 1999, 65 139-151.
60. Zabetakis, I.; Moutevelis-Minakakis, P; Gramshaw, J.W. The role of 2-hydroxypropanal in the biosynthesis of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one in strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. *Elsanta*) callus cultures. 1999, 64 311-314.
61. Wein, M; Lewinsohn, E; Schwab, W. Metabolic Fate of Isotopes during the Biological Transformation of Carbohydrates to 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone in Strawberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2427-2432.
62. Koutsompogeras, P; Kyriacou, A; Zabetakis, I. The formation of 2,5-dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one by cell-free extracts of *Methylobacterium extorquens* and strawberry (*Fragaria _ ananassa* cv. *Elsanta*). *Food Chemistry*. 2007, 104, 1654–1661.
63. Aguiló, I; Oms, G; Soliva, R; Martín, O. Flavour retention and related enzyme activities during storage of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Food Chemistry*. 2009, 116, 59-65.

-
64. Attaway, J.A; Buslig, B. The metabolism of linalool in citrus plants. *Phytdchemistry*. 1969, 8,1671-1673.
65. Vidari, G; Di Rosa, A; Zaroni, G; Bicchi, C. Enantioselective synthesis of each stereoisomer of the pyranoid linalool oxides: the linalool route. *Tetrahedron: Asymmetry*.1999, 10, 3547–3557.
66. Hans O. E; Triigiirdh, G. Aroma Recovery During Beverage Processing. *Journal of Food Engineering*. 1997, 34, 159- 178.
67. Schreier, P; Drawert, F; Junker, A; Mick, W. Orangen-aromastoffe und deren veränderungen bei der saftherstellung. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung undForschung*. Food Chemistry. 1997 164, 188-193.
68. Da Silva, G.A; Augusto, F; Poppi, J. Exploratory analisis of the volatile profile of beers by HS-SPME-CG. *Food Chemistry*.2008, 111, 1057–1063.
69. Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology. Food Chemistry*. 1999, 12, 564–582.
70. Hamilton, T.R.; Archbold, D.D.; Loughrin, J.H.; Collins, R.W.; Byers, M.E. Metabolism of natural volatile compounds by strawberryfruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1996, 44, 2802-2805.
71. Vaughn, S.F.; Spencer, G.F.; Shasha, B.S. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. *Journal offood Science*. 1993, 58, 793-796.
72. Krawczyk1, T.O; Jelen, J; Larsen, A; Jarosz, B. Main compounds responsible for off-odour of strawberriesinfected by *Phytophthora cactorum*. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, 40, 255–259