

Índice

1. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN EN ESPAÑA

M. Gómez

2. EL RETO DEL ANÁLISIS DEL AROMA DE LOS VINOS

J. F. Cacho

1. ESTADO ACTUAL DEL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN EN ESPAÑA

M. Gómez

Departamento de Química Analítica de la UCM

De todos es conocida la enorme importancia del análisis de especiación en la caracterización y determinación de las formas químicas de un elemento, y como medio de llegar al conocimiento de factores tan importantes de metales y metaloides como son su toxicidad, valor nutricional, biodisponibilidad o actividad biológica entre otros. Las propiedades fisico-químicas de estos elementos dependen de la especie presente y regularán su transporte, intercambio y destino en el medio ambiente. Cada vez es más reconocido que los estudios avanzados de especiación poseen un carácter multidisciplinar donde intervienen, y se benefician de la información obtenida, expertos de áreas tan diversas como química analítica (QA), medio ambiente, geoquímica, química clínica, bioquímica, biología, toxicología, entre otras.

En este artículo se muestra una panorámica del trabajo realizado en el área de la especiación analítica en España en los últimos cinco años. La información se ha agrupado por temas de interés, haciendo hincapié en los aspectos más avanzados de la QA. Esta revisión no tiene carácter exhaustivo, dado que el espacio disponible es limitado, por lo que se han incluido únicamente los temas más representativos. Es posible que algunas líneas de investigación merecedoras de aparecer en estas páginas no hayan sido incluidas, por lo que pedimos disculpas por anticipado a los autores implicados.

I. Métodos de tratamiento de la muestra

Se ha trabajado en el desarrollo de métodos de extracción de las especies asistidos con diferentes tipos de interacción, radiación microondas, agitación con ultrasonidos, alta presión, etc., buscando en todo momento la extracción selectiva de las especies pero conservando las especies químicas originales.

Extracción con ultrasonidos: La extracción con ultrasonidos es desde hace años uno de los procedimientos más empleados en los estudios de especiación y se sigue utilizando de manera habitual para la determinación de compuestos organoarsenicales en muestras biológicas de origen terrestre y marino, empleándose como extractantes mezclas de metanol y agua. Además de los clásicos baños de ultrasonidos, se emplean también las sondas de ultrasonidos, que permiten focalizar la energía en un espacio reducido, acortándose el tiempo de extracción. También puede verse una tendencia en su utilización para la determinación de metales en

los esquemas de extracción secuencial, sustituyendo a la agitación mecánica y reduciéndose el tiempo de extracción de horas a minutos. Las posibilidades que ofrece la extracción con ultrasonidos en distintos tipos de muestras han sido revisadas recientemente.

Extracción asistida con microondas: El uso de radiación microondas es un procedimiento que se aplica habitualmente en los estudios de especiación, debido principalmente al corto tiempo de extracción (<10 minutos). Al igual que en el caso anterior, se emplean tanto microondas convenciones como microondas focalizadas. Este método de extracción se ha validado mediante el análisis de materiales de referencia. Se ha empleado recientemente en la determinación de metilmercurio (MeHg) en sedimentos, arsénico en muestras biológicas, marinas y suelos, y organoestánicos en material biológico marino.

Tratamientos enzimáticos: Su uso no está tan extendido en comparación con la energía de ultrasonidos o microondas, ya que en general los tiempos de extracción suelen ser largos (varias horas) y se precisa control de la temperatura para la digestión de la muestra. Suele aplicarse a muestras complejas, de origen biológico, como en la especiación de arsénico en alimentos infantiles digeridos con tripsina y pancreatina. También se han empleado proteasas y lipasas para la hidrólisis y extracción de selenoaminoácidos en muestras de marisco. La elección de la enzima empleada es crítica, ya que puede influir en la posterior separación cromatográfica de los analitos, por lo que a veces es necesario incluir etapas de eliminación de interferentes de la matriz. Cabe destacar el desarrollo de un procedimiento que combina tratamiento enzimático con sonda de ultrasonidos focalizada a temperatura ambiente durante pocos segundos para la extracción de selenometionina en muestras de levadura.

Extracción acelerada con disolventes (ASE): Sus aplicaciones han sido revisadas recientemente, tanto en sus modos de funcionamiento dinámico como estático. Su uso no está todavía muy extendido en los estudios de especiación, quizás debido a que los disolventes que se pueden emplear no pueden ser muy enérgicos (pHs ácidos o altas concentraciones de sales) y a que normalmente son necesarios varios ciclos de extracción, lo que prolonga el tiempo de operación. Se ha utilizado para la extracción de butilestano en un material de referencia, y

se ha comparado su eficacia con la de otras técnicas de extracción (agitación manual, ultrasonidos y microondas). De manera general se han comparado las prestaciones del ASE con las de otros procedimientos más clásicos para compuestos organometálicos.

Microextracción en fase sólida (SPME): Durante los últimos años la SPME ha sido aplicada a la determinación de compuestos organometálicos volátiles, o convertibles en especies poco polares y volátiles, previamente a su separación mediante cromatografía de gases (GC). El mayor número de publicaciones se centra en la especiación de Se y Hg, seguido a continuación por el Sn. En general las primeras aplicaciones se desarrollaron para muestras acuosas, aprovechando el poder de preconcentración de las fibras para alcanzar límites de detección a nivel de los ng/l. A partir de ese momento, la técnica se extrapoló al análisis de extractos de sedimentos y materiales biológicos. El tipo de fibra a utilizar depende de las características de los analitos, así en el caso de compuestos orgánicos de Sn y Hg, en la mayoría de los trabajos se usan fibras de polidimetilsiloxano (PDMS). Para selenio, algunas aplicaciones se centran en la utilización de fibras de CAR (Carbowax)-PDMS para la determinación de compuestos volátiles, tales como dimetilselenio y dimetildiselenio, sintetizados por plantas y levaduras que han sido cultivadas en presencia de selenio inorgánico. Además se ha utilizado el SPME para la determinación de selenoaminoácidos previamente derivatizados con alquilcloroformatos. En la determinación de compuestos de azufre, se ha considerado la utilización de fibras de poliacrilato (PA) y fibras mixtas (tipo PDMS-divinilbenceno (DVB)-CAR) como alternativas al PDMS. La detección de las especies concentradas sobre la fibra suele llevarse a cabo utilizando detectores de tipo selectivo, ej. FPD, MIP-AED ó ICP-MS, acoplados a GC, aunque también se ha descrito la utilización de detectores universales (FID) para la determinación de organoestánicos en muestras de sedimentos. También se ha propuesto la desorción directa de la fibra de SPME tanto en la antorcha de un ICP-MS para la determinación de compuestos de selenio, como en un tubo de cuarzo usado como cámara de atomización en AAS para la determinación de MeHg⁺, sin proceder a una etapa previa de separación cromatográfica.

Extracción en fase sólida (SPE): La utilización de la SPE como método de preconcentración de la muestra, para la determinación de compuestos organometálicos mediante GC se ha visto relegada a un segundo plano desde la aparición

de la SPME. No obstante, la técnica se sigue utilizando para la preconcentración de compuestos de Hg y Sn en muestras acuosas cuando se procede a su determinación mediante HPLC. Una ventaja adicional de esta técnica sobre la SPME, es la posibilidad de preconcentrar de manera selectiva elementos en diferentes estados de oxidación en base a su distinta capacidad para formar complejos neutros con distintos agentes quelatantes. A continuación, estos complejos se concentran sobre materiales en fase reversa. Por otro lado, la utilización de adsorbentes con carácter de intercambiadores iónicos resulta imprescindible en los procesos de extracción y purificación de especies iónicas. Además se ha descrito la combinación de materiales de tipo intercambiador y de fase reversa para la preconcentración simultánea de especies iónicas y apolares de selenio en muestras de agua.

Pervaporación (PV): Otra aproximación en estudios de especiación es el acoplamiento de sistemas de pervaporación con detectores de espectroscopia atómica. Se ha descrito la combinación con un sistema FIA y fluorescencia atómica (AFS) para la especiación de arsénico en muestras acuosas con partículas en suspensión, o la combinación con AAS para la especiación de Hg tanto en muestras sólidas como líquidas.

Ultrafiltración: Se ha empleado junto con HPLC para estudiar la especiación de aluminio en suero tras la administración de deferoxamina con la que forma complejos fácilmente eliminables mediante diálisis. Se observa que se dializan otras especies diferentes del complejo con deferoxamina con pesos moleculares del orden de 1 a 5 kDa.

II. Tendencias Instrumentales en especiación

Cromatografía de gases (GC) con detectores selectivos: La utilización de la cromatografía de gases con detectores atómicos (AAS, AED o ICP-MS) como técnica de especiación está limitada a compuestos volátiles y poco polares (o fácilmente convertibles en especies con estas propiedades) de, entre otros, Sn, Hg, Se, Pb, Tl y Mn además de un número relativamente elevado de compuestos orgánicos de azufre. Una de las tendencias más recientes apunta hacia el uso de columnas multicapilares de reducida longitud para completar las separaciones cromatográficas en un tiempo normalmente inferior a 2-3 min. Estas

columnas operan a flujos de gas portador muy elevados (hasta 200 ml/min) y resultan fácilmente combinables con detectores de espectrometría atómica, aunque no pueden conectarse con espectrómetros de masas usando ionización química o impacto electrónico. Cabe destacar que debido a que el flujo de gas portador en el portal de inyección es superior al utilizado con columnas capilares convencionales con inyección en modo splitless, el tiempo de desorción es de sólo unos segundos, alargando de esta manera la vida útil de las fibras. El mayor número de trabajos realizados se centra en la utilización de GC-ICP-MS, debido seguramente a la relativa novedad de las interfases con GC, a su excelente sensibilidad y selectividad, así como a su carácter de detector multielemental, le sigue la GC-MS y la GC-MIP-AED.

Cromatografía de Líquidos (HPLC)-ICP-MS y ESI-MS. La creciente necesidad de obtener información, no sólo de los metales y/o metaloides asociados a biomoléculas (información obtenida mediante técnicas híbridas) sino de la especie en concreto de la que se trata, ha impulsado el empleo de técnicas de Espectrometría de Masas estructural con fuentes de ionización como el Electrospray (ESI) o el Láser Asistido por Matriz (MALDI). El Electrospray, asistido (ion spray) o no por nebulización, es la fuente de ionización más suave de las empleadas en Espectrometría de Masas permitiendo una mínima fragmentación de las moléculas y ha sido utilizada ampliamente para el análisis tanto de pequeños aminoácidos como de péptidos y proteínas en proteómica clásica. Por otro lado, la fuente MALDI tiene la ventaja de producir en su mayor parte especies monocargadas, lo que simplifica notablemente la interpretación de los espectros de masas y permite el estudio de proteínas intactas de pesos moleculares de hasta 100 kDa. Cada vez son más numerosas las publicaciones dedicadas a la especiación de biomoléculas que incorporan una parte dedicada a la determinación estructural del compuesto en el que determinado metal/metaloides está formando parte, de forma complementaria a la información proporcionada mediante técnicas híbridas. Por lo general, la mayor parte de estos estudios se han llevado a cabo utilizando el ESI como fuente de iones, puesto que se trata de una técnica que se puede acoplar *on-line* con las separaciones cromatográficas si fuera preciso.

Elucidación de pequeños metabolitos del Selenio y Arsénico: Mediante el uso complementario de ICP-MS y ESI-MS (con espectrómetro de Cuadrupolo (Q)-Tiempo de Vuelo (TOF)) ha sido posible elucidar la estructura

del metabolito mayoritario del Se en orina de rata suplementada con Se (IV). Para ello ha sido necesario el uso de cromatografías complementarias (exclusión por tamaños (SEC) seguida de cambio aniónico) después de la limpieza de las muestras utilizando la extracción con éteres corona. Una metodología similar se ha empleado para determinar la estructura de pequeños metabolitos del Se en plantas acumuladoras. En este caso, la utilización (por separado) de dos cromatografías complementarias como la fase reversa con pares iónicos y el intercambio catiónico junto con el empleo del ESI-Q-TOF (MS y MS/MS) han permitido caracterizar la Se-metilselenometionina como la especie del Se más abundante en las raíces de *Brassica juncea* expuesta a Se-metionina. De forma similar, se ha llevado a cabo la identificación del arsenozúcar 2 en muestras de ostras de la costa atlántica de España. Aunque en este caso los efectos de matriz en el sistema LC-MS fueron importantes, estos pudieron minimizarse llevando a cabo la limpieza de los extractos mediante cromatografía de exclusión por tamaños y cambio aniónico antes del LC-MS.

Polipéptidos y proteínas: Una instrumentación similar se ha empleado en el caso de la identificación de "fitoquelatinas", polipéptidos quelantes sintetizados por plantas expuestas a la contaminación de metales y/o metaloides. Estos polímeros de glutatión (tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina) ligan metales como Cd y metaloides como el As formando complejos cuyo peso molecular puede llegar a los 3000 Da. La posibilidad de emplear plantas como remediadoras de la contaminación metálica de los suelos (fitoremediación) ha impulsado el desarrollo de metodologías para el estudio de dichos complejos empleando la SEC seguida del recogido y preconcentración de las fracciones de interés para su posterior análisis por ESI-Q-TOF. Asimismo, tanto el MALDI-TOF como el ESI-Q-TOF se han utilizado en la elucidación de proteínas con Se en levaduras enriquecidas en dicho elemento. Como en casos anteriores se han empleado cromatografías complementarias, en primer lugar SEC-ICP-MS para la separación de las especies de alto peso molecular que contienen Se, seguida de la digestión trípica de dichas fracciones y fase reversa (RP-ICP-MS) para la separación de los Se-péptidos originados. Dichos Se-péptidos se analizan paralelamente mediante MALDI-TOF (donde se observa el ión +1 y el patrón de abundancias isotópicas

del Se) y por ESI-Q-TOF (para poder llevar a cabo el MS/MS de los fragmentos).

Electroforesis Capilar (CE)-ICP/MS: Se ha trabajado en el estudio de diferentes interfases basadas en nebulizadores Mehinhard, Babinton, MicroMist, y de alta eficiencia (HEN), siendo estos últimos los que proporcionan mejores eficiencias, así como en el acoplamiento con un sistema generador de hidruros para el análisis de especies volátiles tras sufrir reducción con borohidruro sódico. También se ha trabajado en el desarrollo de métodos de preconcentración basados en el apilamiento de muestra (*sample stacking*) para mejorar los límites de detección. Dentro de estos estudios se ha abordado la especiación de metalotioneínas de Cd, Cu y Zn en hígado de pescado, de metalotioneínas de Cd en citosoles hepatopancreáticos de moluscos, de Hg en materiales biológicos, y el análisis de enantiómeros de selometionina en levaduras suplementadas con Se.

III. Principales muestras estudiadas

Tejidos biológicos y alimentos: Probablemente la línea de trabajo que más resultados ha generado es la de la determinación de especies de arsénico en peces, moluscos y crustáceos. Algunos trabajos se limitan a distinguir entre As(III) y As(V), pero la mayoría incluyen otras especies de indudable interés como los ácidos monometilarsónico (MMA) y dimetilarsónico (DMA), arsenobetaína (AsB) y/o arsenocolina (AsC) También se han determinado alguna de estas especies en alimentos infantiles manufacturados, cerveza, huevos y vegetales variados. Asimismo, se ha estudiado la absorción del suelo y posterior acumulación de especies de arsénico en diversos tipos de plantas. Otra línea en la que se ha trabajado intensamente corresponde a la especiación de mercurio en pescado. Las especies más representativas son mercurio inorgánico, MeHg y dimetilmercurio (Me₂Hg). Se han investigado específicamente las etapas de secado de muestra y extracción y se han desarrollado métodos de análisis, combinando técnicas de separación con detectores selectivos, como GC-MIP-AED, CE-HG-ICP-MS o GC-AFS (en pelo humano) o esquemas de reducción selectiva para diferenciar entre Hg²⁺ y mercurio total, por una parte y Hg²⁺ y MeHg por otra en mejillones, pelo humano y estiércol. En lo que se refiere a la especiación de estaño, se han realizado estudios sobre estabilidad de tributil (TBT) y trifeníl estaño (TPHT) en ostras, berberechos, sedimentos y agua marina, sobre la asimilación y posteriores vías de eliminación de TBT por parte de almejas.

Asimismo, se han desarrollado métodos analíticos para la determinación de mono, di, tri, butil y fenil estaño en moluscos, sedimentos y agua y se ha monitorizado la concentración de estas especies en este tipo de muestras de la costa sudoeste española. La especiación de selenio en levadura, mostaza y ajo, así como en atún y mejillón también ha sido objeto de estudio. Mención especial merece el capítulo dedicado a la proteica, campo en el cuál se han publicado un número considerable de artículos, tanto artículos de revisión general, como estudios específicos sobre diversos metales unidos a proteínas tipo metalotioneina de hepatopancreas de mejillón e hígado de anguila o conejo, utilizando diversas técnicas de espectrometría de masas. También se ha publicado un trabajo sobre especiación de cadmio unido a metalotioneinas de hígado de peces.

Sedimentos, suelos y lodos residuales: Las investigaciones se centran en la etapa de preparación de la muestra, la estabilidad de los compuestos o el empleo de dilución isotópica. La mayoría de los estudios en sedimentos se han realizado sobre estaño, así se ha descrito la determinación de mono, di y tri metil, butil y/o fenil estaño utilizando diversas técnicas combinadas. La concentración de algunos de estos contaminantes se ha monitorizado en sedimentos y lodos residuales. Se han desarrollado métodos para la determinación de alguna de estas especies mediante PV y GC con detección fotométrica de llama (PV-GC-FPD), GC-MIP-AED, SPME-GC-MS o HPLC con detección fluorimétrica. También se ha descrito un método para la medida de estaño orgánico total por GFAAS. Se han revisado los diferentes tipos de detectores utilizados en especiación de organoestánicos HPLC. Se ha trabajado en esquemas de especiación simultánea de estaño y plomo en sedimentos y en la determinación de organoplúmbicos en partículas atmosféricas. Se han comparado las técnicas (HPLC-HG-AFS vs. HPLC-HG-ICP-MS) para la especiación de arsénico en muestras medioambientales, se ha estudiado específicamente la etapa de extracción de especies de arsénico de sedimentos ricos en óxido de hierro, así como la diferenciación entre As(III) y As(V) haciendo uso de la generación selectiva de hidruros y se han propuesto métodos para la medida de arsénico inorgánico, así como de arsenito, arsenato y metilarsénicos en suelos. Además, se han publicado una serie de artículos sobre

diversos aspectos relacionados con la especiación de selenio y mercurio en sedimentos y de mercurio en suelos contaminados.

IV. Especiación miscelánea

En lo relativo a la especiación de enantiómeros de Se ha trabajado básicamente con selenoaminoácidos, estudiándose tanto los acoplamientos de técnicas de separación capaces de resolver especies enantioméricas con ICP-MS, como la posibilidad de realizar la separación con y sin derivatización previa. En estos estudios la muestra objetivo ha sido levadura enriquecida en selenio, y se han podido resolver los enantiómeros de la selenometionina y de la selenoetionina. Otra línea de trabajo ha sido la especiación de Ca y Zn en soluciones nutritivas conteniendo caseína, glucosa y fructosa para determinar su biodisponibilidad mediante ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, observándose que el pretratamiento de los alimentos puede modificar la asimilación de estos elementos, lo que puede ser crítico en dietas deficientes en los mismos. Entre otros estudios que se están realizando, mencionar el desarrollo de polímeros de impresión molecular para el aislamiento, preconcentración y especiación de compuestos organoestánicos, y su aplicación a aguas, biota y sedimentos. En cuanto al empleo de membranas en sistemas acuáticos, mencionar el desarrollo de sistemas de muestreo pasivo para la monitorización de compuestos organomercúricos y organoestánicos en aguas. En estos sistemas la acumulación responde a un proceso de difusión pasiva, por lo que la masa de organometálicos acumulada en la membrana receptora informa de la concentración media de las especies en el agua para tiempos de exposición prolongados. También se han empleado membranas líquidas en estudios de especiación de cromo y de lantánidos, basándose en los diferentes coeficientes de permeación que presentan las distintas especies en solución.

V. Dilución isotópica

Uno de los problemas que se plantea en los estudios de especiación (al igual que en otras áreas de la QA) es la falta de seguridad en la exactitud y trazabilidad del proceso analítico global. En este sentido la técnica de dilución isotópica se está empleando en estudios de especiación, aunque aún a pequeña escala, para la detección de posibles transformaciones de especies que pudieran acaecer durante el análisis. Se observan dos modalidades, adicionar las especies enriquecidas en un isótopo o adicionar los isótopos metálicos *on-line* a continuación de una determinada separación, normalmente por HPLC. Recientemente, en los estudios de certificación de nuevos materiales de

referencia de estaño y mercurio se han utilizado técnicas de dilución isotópica con detección por ICP-MS. A priori, la única limitación dentro de esta segunda tendencia se centra en la disponibilidad de analitos marcados isotópicamente, en España se han sintetizado patrones para Cr y organoestánicos enriquecidos en distintos isótopos estables de Sn.

VI. Algunas estadísticas.

La importancia actual de este área de la QA queda patente a la vista del elevado número de publicaciones, alrededor de 500 por año. La contribución de España a esta producción científica es importante, en torno a 160 artículos en los cinco últimos años, lo que nos sitúa en un 6.5% anual. Cabe destacar

que alrededor del 85% de las publicaciones pertenecen a revistas del área de QA y afines con un elevado índice de impacto (primer tercio de las tablas del SCI). Asimismo, en un tercio de las publicaciones se emplea el ICP-MS como técnica de análisis. Resaltar que en la gran mayoría de las universidades españolas hay grupos dedicados a la especiación, lo que muestra que no se trata de una actividad minoritaria con una gran producción científica, sino de un campo de estudio muy extendido en la QA española. Si bien, hay un amplio campo de estudio en áreas como la metalómica, donde se precisa de la estrecha colaboración de expertos en QA, bioquímica, medicina, etc.; así como el empleo de instrumentación muy avanzada (MALDI-TOF, ESI-MS, etc.).

2. EL RETO DEL ANÁLISIS DEL AROMA DE LOS VINOS

J.F. Cacho Palomar

Departamento de Química Analítica. Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología. Facultad de Ciencias. Instituto de Investigación I3A. Universidad de Zaragoza

El desarrollo del Análisis Instrumental y su posterior popularización ha hecho que numerosos grupos de investigación dediquen sus esfuerzos a conocer la composición de los vinos.

La irrupción de la cromatografía en fase gas, los avances en la construcción de columnas capilares con fases estacionarias ligadas de polaridades muy diversas y el empleo de detectores sensibles y específicos, principalmente el de Espectrometría de Masas, ha permitido aumentar, de día en día, la lista de compuestos volátiles identificados en los vinos. De esta forma a los alcoholes, ácidos, ésteres, etc. identificados por procedimientos clásicos y con contenidos de porcentajes se fueron añadiendo otras familias de compuestos como los terpenoles (1956) y las metoxipiracinas (1975) de forma que ya en 1979 había 600 componentes volátiles descritos. Este número llegaba a 800 en 1989 y desde esa fecha la cifra ha seguido creciendo por lo que se puede concluir que a día de hoy el número será cercano a 900. Evidentemente las concentraciones a las que se hallan los últimos compuestos identificados son de trazas y únicamente se han podido identificar tras tediosos trabajos de aislamiento y preconcentración. Por tanto en el vino coexisten sustancias volátiles a niveles de porcentajes, denominados componentes mayoritarios, con otras a nivel de nanogramos

por litro denominados componentes minoritarios.

En el trabajo cromatográfico, como sabemos, el grado de separación entre dos sustancias se expresa como resolución y se acepta que una resolución unidad corresponde a dos sustancias perfectamente separadas, es decir, que abandonan la columna cromatográfica una inmediatamente después de la otra. La capacidad de una columna cromatográfica de separar sustancias se expresa por el número de platos teóricos que proporciona. Una columna capilar moderna proporciona algo más de 100.000 platos teóricos. Puede parecer que con semejante número de platos el problema de la separación de los componentes volátiles del vino estaría resuelto. Sin embargo no es así. Giddings, el introductor de las columnas capilares, calculó que harían falta alrededor de 500 millones de platos teóricos para separar 100 componentes de una mezcla con una resolución de 0,99.

¿Qué significa esto en el caso del análisis de los compuestos volátiles del vino? Sencillamente que multitud de sustancias coeluyen de la columna cromatográfica. Si coeluyen compuestos mayoritarios con compuestos traza y se está llevando a cabo el análisis de los mayoritarios, esta coelución no tiene importancia ya que el aumento del área de un pico mayoritario por la presencia de un traza es despreciable. Sin embargo lo contrario invalida el análisis de la traza y para eliminar esta interferencia es

necesario recurrir a etapas previas de tratamiento de la muestra.

Los modernos detectores cromatográficos, específicos o universales, son muy sensibles, pero su sensibilidad es muy inferior a la necesaria para cuantificar compuestos a las concentraciones a las que se hallan los componentes minoritarios en el vino.

En resumen el primer reto que encuentra el químico analítico en el análisis completo del aroma de un vino desde un punto de vista instrumental, es separar y concentrar los compuestos minoritarios previamente a su inyección cromatográfica sin alterar su composición relativa.

Cuando lo que se demanda en el análisis de un vino es el contenido de otros productos, a niveles de traza, distintos de los aromas, como por ejemplo, los residuos de pesticidas, la dificultad es bastante inferior por la menor cantidad de estos compuestos aunque no deja de tener su dificultad por otros factores. La interpretación del resultado de estos análisis es inmediata. Si la concentración de alguno de ellos, o su suma, es mayor que una determinada cantidad, ese vino no es apto para el consumo y el enólogo desde el primer momento sabe lo que los datos analíticos significan. Los toxicólogos han realizado un trabajo previo de evaluación de riesgo y han fijado unos límites máximos tolerables que son bien fáciles de entender. Sin embargo cuando lo que se muestra es el resultado del análisis de los aromas de un vino no hay enólogo que sepa decir a que olerá ese vino, a no ser, claro está, que haya un componente impacto, u otro responsable de un defecto en concentraciones llamativas ¿A que se debe esto? Sencillamente a que no se conoce el olor que puede tener una mezcla de diversos aromas. Es impredecible la respuesta integrada en el cerebro de los estímulos generados en la pituitaria por las distintas moléculas de tales aromas y únicamente "a posteriori" se puede achacar un determinado olor a un componente o mezcla de componentes.

En el análisis de odorantes, a diferencia de los pesticidas, el interés no está en los analitos "per se", sino en su correlación con la percepción del aroma. Esto significa que el análisis del olor implica la determinación de un concepto fisiológico vía medidas físico-químicas de sustancias volátiles. En el caso del vino esto supone un número de restricciones analíticas único, y el mayor reto.

Para superarlo es necesario conjugar el análisis instrumental con la respuesta de nuestros sentidos.

A pesar de que nuestro organismo en el transcurso de la evolución ha perdido sensibilidad en la detección de olores, todavía nuestra capacidad de percepción es asombrosa y ha sido aprovechada por los científicos que han trabajado en dos direcciones complementarias. Una la del análisis sensorial, con sus correspondientes ensayos de evaluación y otra la del análisis instrumental cromatográfico en la que se utiliza la nariz como detector, es decir, la Cromatografía de Gases- Olfatometría (CG-O).

El análisis sensorial es una disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones humanas a aquellas características de los alimentos y materiales que son percibidas a través de los sentidos de la vista, oído, olfato, gusto y tacto.

Para expresarse con rigor científico y para establecer comparaciones, el análisis sensorial ha definido una serie de límites o umbrales en la percepción de las sensaciones olfativas y gustativas. Estos umbrales se refieren a los detectados por una proporción de un grupo de individuos, normalmente el 50% y ninguno de los límites es invariante.

En la bibliografía figuran los datos de umbrales de percepción de numerosas sustancias, aunque evidentemente para poder compararlos es necesario que se encuentren en la misma matriz, pues esta juega un papel muy importante en la percepción.

A la relación entre la concentración analítica de un odorante y su umbral de detección se denomina valor de aroma. Este dato es importante en el trabajo con odorantes. Cuanto más alto sea más importante será ese aroma.

El análisis sensorial utiliza paneles humanos y una metodología que puede agruparse en dos categorías: test analíticos y test afectivos o hedónicos. Su finalidad es muy diferente. En los analíticos lo que se pretende es obtener información sobre las características del alimento y el panel juega un papel similar al de un instrumento analítico. De forma similar, también en este caso se toman medidas para minimizar las diversas formas de dispersión que pueden influir en sus prestaciones y para reducir el efecto de la variación biológica natural. En los hedónicos, lo que se busca es una respuesta en términos de preferencia o aceptabilidad. Para los test analíticos, que pueden subdividirse en discriminativos y descriptivos, se utilizan paneles con pocas personas bien entrenadas, mientras que para los hedónicos se utilizan respuestas de muchas personas sin entrenamiento previo.

Los ensayos descriptivos se emplean para caracterizar cualitativa o cuantitativamente una o

más propiedades sensoriales de una o más muestras. Los más utilizados son Clasificación, Ordenación, Calificación, Puntuación, Test Descriptivo Simple y Test de Perfil Sensorial.

Desde un punto de vista químico-analítico posiblemente los más interesantes sean los descriptivo simple y de perfil sensorial.

En el descriptivo simple el panelista debe identificar y describir los atributos sensoriales. El conjunto de descriptores de todos los panelistas puede ordenarse según frecuencia de cita y también pueden discutirse en orden a llegar a un consenso y fijar únicamente aquellos en que todo el panel esté de acuerdo.

En el perfil sensorial, que se realiza después del anterior, se cuantifican los atributos sensoriales previamente aceptados.

En el caso del estudio del aroma el sentido del olfato es, obviamente, el que juega el papel más importante. La mayoría de las veces la información que con él se obtiene no es cuantitativa, pues los panelistas por lo general no cuantifican la intensidad de cada descriptor, sino que ponen toda su atención en establecer la calidad del aroma. En el aspecto cuantitativo, únicamente los términos “muy” o “poco” (muy intenso, poco intenso) son los habitualmente usados. Por el contrario, se emplean con frecuencia términos hedonistas, como agradable, bueno, fino ..., etc. que no tienen nada que ver con el análisis cuantitativo descriptivo. Esto podría hacernos creer que el olfato no es capaz de cuantificar. Nada menos cierto. Bajo condiciones estandarizadas somos capaces de reproducir la sensación cuantitativa de un aroma y por consiguiente hacer el análisis cuantitativo de un odorante utilizando nuestro olfato. Esto es muy importante, pues permite cuantificar odorantes para los que no existe todavía metodología analítica instrumental o no se dispone de la misma. En nuestro Laboratorio de Análisis del Aroma hemos estudiado mucho esta olfatometría cuantitativa.

Para explicar las características del aroma y de su percepción me he basado en que las moléculas odorantes alcanzaban la pituitaria al respirar por la nariz, por lo que se denomina la vía ortonasal. Es decir, implícitamente estaba diciendo que las moléculas de ese aroma eran volátiles y que al describir el aroma de un vino lo que hacíamos era decir a que olían los vapores que se desprendían de su copa y que respirábamos. Pero en la vida ordinaria el vino no lo empleamos únicamente para el disfrute

del olfato, como si fuera una colonia, sino que lo ingerimos, lo degustamos, pues su misión fundamental es mitigar la sed agradando. Cuando nos llevamos el vino a la boca, lo ingerimos y respiramos, las percepciones que sentimos completan y amplifican las que previamente habíamos sentido por el olfato y nos crean en el cerebro una imagen mucho más rica, mucho más nítida, que la preferente. Vamos a explicar el por qué.

En primer lugar porque la pituitaria está comunicada con la boca por lo que denominamos la vía retronasal y en segundo porque lo que acontece en la boca es algo muy distinto a lo que puede suceder en el conducto ortonasal.

En la boca la temperatura media es de 37° C, mucho más alta que la del vino, y las glándulas salivares continuamente segregan saliva para lubricar. Además está la lengua con capacidad de movimiento y con otra serie de receptores.

Al ingerir el vino, lo mismo que cualquier otro alimento, se calienta, se ensaliva y con el movimiento de la lengua se reparte y presiona por toda la boca, especialmente contra el paladar. Al tragar, se generan unas ondas de presión que facilitan que los gases de la boca puedan expulsarse por la nariz. Consecuencia de todo esto es que las moléculas del vino menos volátiles pasan a fase gas por el aumento de temperatura, el movimiento de la lengua y el gran aumento de superficie de evaporación. El vino en contacto con la saliva modifica su tensión superficial y forma una capa muy fina que puede llegar a ser monomolecular. Según las últimas teorías, esta capa puede ascender por la vía retronasal y alcanzar la pituitaria, lo que abriría el camino a las moléculas no volátiles para alcanzar los receptores olfativos y dar la correspondiente señal. Por otra parte se ha puesto de manifiesto que determinadas moléculas de aromas se encuentran asociadas con fenoles y otras sustancias en el seno del vino, y esa asociación se rompe en contacto con la saliva, lo que origina un aumento considerable de moléculas odorantes en la fase gas. El aumento de moléculas que llegan a la pituitaria por todos estos factores es, en parte, el responsable del cambio en la imagen del vino. La polaridad de las moléculas juega un papel importante en el aumento de la percepción.

El vino en contacto con nuestras papilas gustativas produce sensaciones de dulzor, salinidad, acidez y amargor y además, al activar los terminales del sentido del tacto, las de astringencia y untuosidad. Por otra parte se sienten las sensaciones de calor o frío. Es decir, que simultáneamente el cerebro recibe

información de cuatro sentidos diferentes y las integra en una única imagen, por lo que, instintivamente, se tiende a no diferenciar el olor de todo el conjunto, que se denomina sabor. Coloquialmente empleamos instintivamente las palabras gusto a chocolate, a naranja, etc., cuando en realidad deberíamos decir sabor. Pues bien, para que el vino sea vino debe tener sabor, no solamente olor. Esta es una premisa que no debe olvidarse nunca, aunque con frecuencia quienes trabajan con el aroma tienen a minusvalorarla por ser el olfato el que más contribuye al sabor.

El análisis del aroma del vino se ha asociado durante mucho tiempo a la determinación de todas sus sustancias volátiles. Esto ha sido un error grave, pues ser volátil no significa que tenga propiedades aromáticas. A día de hoy, como ya se ha citado, hay descritos en la bibliografía unos 900 compuestos volátiles en los vinos. Si todos estos compuestos contribuyesen al aroma de un vino sería prácticamente imposible el intentar comprender su aroma, y no merecería la pena el trabajar en este tema. Pero, afortunadamente, de esa multitud de compuestos solo unos pocos, alrededor de 60, son contribuyentes natos del aroma. Los demás prácticamente no intervienen. Esto simplifica enormemente el trabajo de identificación, aunque quede todavía la tarea de estudiar sus sinergismos y antagonismos.

El análisis de los compuestos del aroma se lleva a cabo, obviamente, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y por olfatometría. Precisamente el empleo de esta modalidad de detección fue la que revolucionó el estudio del aroma del vino.

La CG-O nació como una necesidad de localizar en un cromatograma la señal originada por un compuesto odorífero al abandonar la columna cromatográfica. Multitud de sustancias odoríferamente activas no dan señal en el detector cromatográfico habitual, FID, a las concentraciones en que pueden percibirse sensorialmente. Por consiguiente la sustitución en el Cromatógrafo de Gases del detector electrométrico por la nariz humana ha dado origen a una nueva o modificada técnica analítica, la olfatometría, que permite medir dos variables, la actividad de olor y el tiempo al que abandonan la columna cromatográfica, esto es, su tiempo de retención.

Establecer y registrar la actividad de olor detectado en CG-O es una nueva variable

más complicada que el tiempo de retención, puesto que hay que considerar la identificación de la cualidad del olor, de su intensidad y de su potencia. La intensidad odorífera de un estimulante es la percepción que origina a una concentración dada mientras que su potencia, relativa a algún otro estimulante, es una comparación de sus niveles a la misma intensidad de respuesta. Ambos por tanto están ligados a la concentración.

La representación gráfica de la intensidad de un estímulo frente al tiempo de retención origina lo que denominamos un aromograma.

Gracias a la CG-O se pueden jerarquizar los odorantes de una muestra. Esto puede hacerse de diversas formas. En una de ellas, denominada AEDA (Aroma Extract Dilution Análisis) se cromatografían diluciones cada vez más diluidas de la muestra o de su extracto. La importancia de cada odorante se determina por la dilución a la que se ha sentido su sensación por última vez. Cuanto mayor es la dilución tanto más importante es el odorante.

En el caso de muestras contaminadas el único (o únicos) estímulo que debe registrarse es el del olor idéntico al del contaminante de la muestra o los olores anómalos, por lo que la interpretación de su aromograma es sencilla. Si lo que se investiga es la totalidad de odorantes el problema no es tan simple. De cualquier forma, si un estándar se inyecta en la columna cromatográfica en las mismas condiciones y origina un estímulo al mismo tiempo de retención y con idénticas características odoríferas, normalmente se afirma que es el mismo compuesto. Una confirmación debe realizarse llevando a cabo otros aromogramas en columna con fase estacionaria muy distinta y utilizando la CG-MS.

Gracias a los estudios olfatométricos y al análisis sensorial con los ensayos de adición y supresión podemos distinguir en el aroma del vino cuatro grupos diferentes:

Aromas irrelevantes: Son la mayoría de los 900 compuestos volátiles presentes en la mayoría de los vinos. Aunque algunos de ellos están en concentraciones altas, si se eliminarán del vino no se notaría su falta.

Aromas base o constitutivos: Son componentes que se encuentran en concentración suficiente para ser percibidos y que su modificación no provoca cambios aparentes en el aroma. Se encuentran en todos los vinos. En este apartado se podrían incluir aquellos compuestos que por acción sinérgica con otros, y

en su conjunto, pueden percibirse, pero sin alterar el aroma base.

El aroma base está formado por unos 15 componentes. Al menos contiene cinco aromas cuya concentración es igual o superior a 20 unidades de aroma. En vinos tintos pertenecen a este grupo el hexanoato y el octanoato de etilo, el acetato de isoamilo, el ácido isovalerianico y la β -damascenona. También son importantes los ácidos grasos butírico, hexanóico y octanóico, los alcoholes de fusel isoamílico y fenil etílico, los ésteres de los isoácidos isobutírico e isovalerianico y el de acetilo. Normalmente tienen valores de aroma superiores a 5.

Los aromas de los vinos blancos y rosados contienen muchos más ésteres de ácidos grasos y acetatos que los tintos. De ahí, en parte, su diferente aroma. En cuanto a las notas aromáticas podemos ver que hay frutales al menos de tres tipos distintos, florales de dos, lácteos y ácidos.

Si alguno de estos componentes aumenta su contenido fuera de la normalidad, o disminuye por debajo de su valor umbral, lo que se percibe es un defecto en el vino.

Aromas sutiles: Son aquellos que, aún no siendo predominantes en el aroma, le proporcionan las notas o tonos diferenciales, como por ejemplo, la nota a flor blanca de naranjo o de acacia. También se encuentran en casi todos los vinos, y su composición abarca un amplio espectro de olores. Su concentración únicamente supera ligeramente su umbral de detección; de lo contrario, es decir, si se hacen preponderantes, constituyen un defecto.

Al segundo apartado y dentro del grupo de los aromas sutiles, se pueden incluir una gran variedad de compuestos cuya enumeración sería demasiado larga (unos 16 compuestos). Su origen es muy variado. Proviene tanto de las uvas como de la acción de levaduras y bacterias, y en algunos casos el oxígeno ha jugado un papel importante en su generación.

Aromas impacto: Son aquellos que su presencia modifica de forma sustancial el aroma del vino, o de forma sutil si varía su concentración. Al igual que en el caso anterior también podrían incluirse en este apartado los compuestos, que en grupo, son capaces de percibirse, pero que aquí modifican el aroma del vino.

A los compuestos individuales impacto, o mejor dicho, gran impacto, pertenecen familias de compuestos muy dispares. Están los terpenos, los compuestos tiólicos, y el metional, los fenoles volátiles etil guayacol y etil-fenol y el diacétilo.

Otros compuestos impacto bien conocidos son las piracinas, y son muy característicos de las variedades de uva Merlot y Cabernet.

Para establecer la concentración de estos odorantes pueden seguirse diversas estrategias no excluyentes entre sí, que finalizan en una cromatografía de gases. La primera de ellas es el análisis por espacio de cabeza (HS).

Si se considera que el aroma del vino es el que se siente al respirar los vapores que se desprenden al tenerlo en una copa, no hay duda que esa técnica analítica, el HS estático, es la mejor opción. Es rápida, simple, reproducible, automatizable y prácticamente no necesita tratamiento de muestras. Su mayor inconveniente estriba en que los compuestos minoritarios con presiones de vapor bajas se encuentran en fase vapor en cantidades inferiores a los límites de detección de los detectores cromatográficos. En consecuencia el resultado del análisis por HS es incompleto. El empleo del HS dinámico solventa, en parte, ese problema, ya que al forzarse el desprendimiento de las sustancias volátiles y no tener que alcanzarse el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa, la masa de analitos que se retienen y luego analizan supera en muchos casos los límites de cuantificación. Por tanto el empleo de esta técnica es, en principio, muy aconsejable. Sin embargo el comportamiento del vino en el tubo de desprendimiento gaseoso no es igual que en la boca por las razones antes señaladas y la composición de los vapores que se desprenden en el instrumento es diferente a la de los que alcanzan la pituitaria.

Este inconveniente puede solventarse modificando las condiciones de desprendimiento gaseoso para asemejarlas a las de la boca humana, es decir, hacer una boca artificial. Esto puede conseguirse trabajando a 37° C, mezclando el vino con saliva (natural o sintética) y borboteando nitrógeno con un caudal similar al de inspiración de aire por la boca. Los resultados que se obtienen utilizando esta técnica son más similares a la realidad que los anteriores.

En la mayoría de los casos lo que se demanda en el análisis del aroma del vino es la composición total, independientemente de las interacciones de sus componentes. En estos casos hay que recurrir a algún tipo de extracción, con un requisito imprescindible para cualquiera de

ellas: Que sensorialmente la muestra y el extracto presentan el mismo olor.

Por supuesto que para determinados compuestos mayoritarios el análisis cromatográfico puede hacerse por inyección directa del vino, pero la mayoría de los laboratorios prefieren recurrir a la extracción líquido-líquido, ya que, además de ser más limpia, permite analizar muchos más componentes. La microextracción empleando como agente de extracción diclorometano o la mezcla diclorometano-pentano es una alternativa rápida, sencilla y robusta.

La determinación de componentes minoritarios necesita una etapa de preconcentración. Las dos estrategias que más se utilizan actualmente son la microextracción en fase sólida (SPME) en espacio de cabeza y la extracción en fase sólida (SPE).

La SPME es muy apropiada para proporcionar un perfil del aroma aunque, evidentemente, puede aprovecharse su capacidad para concentrar compuestos volátiles para el análisis cuantitativo de muchas familias de aromas. La selección de la polaridad de la fibra es esencial para estos análisis, con objeto de aumentar la selectividad, aunque el espesor también juega un papel importante.

El mayor inconveniente de la SPME en el análisis de los compuestos volátiles del vino es su gran sensibilidad a los cambios de las condiciones experimentales; estos afectan mucho a los coeficientes de distribución de los analitos y por tanto a la reproducibilidad. Por tanto para análisis cuantitativo es necesario mantener muy bien controladas todas las variables experimentales.

Una novedad muy interesante en el empleo de la SPME es la posibilidad de derivatizar directamente en la fibra los compuestos volátiles por reacción con el reactivo de derivatización previamente retenido en la misma. De esta forma se ha determinado el contenido de aldehídos en cerveza. Los intervalos de calibración fueron 0,01-50 ppb, lo que nos da idea de la gran sensibilidad que se alcanza con la derivatización.

La SPE ha ido ganando adeptos paso a paso merced a la introducción de nuevos

sorbentes que han ampliado enormemente el número y características de los aromas retenidos. Las resinas de nueva generación tales como las Lichrolut EN, las OASIS, etc. retienen fuertemente compuestos de una cierta polaridad, por lo que mediante una adecuada selección de disolvente de limpieza pueden aislarse familias de compuestos de gran importancia sensorial. De esta forma se han aislado y determinado compuestos tan importantes como por ejemplo los aldehídos de 8-10 átomos de carbono, eliminando la interferencia de otros compuestos carbonilos que se hallan en el vino en mucha mayor cantidad como el etanal, ácido piruvico, acetoina o diacetilo.

Lo mismo puede decirse de los tioles, las lactonas, piracinas, etc. , de forma que sin exagerar se puede afirmar que la SPE es a día de hoy insustituible en el análisis de los compuestos minoritarios.

De forma similar a la descrita para la SPME, también es posible derivatizar directamente en las resinas compuestos previamente retenidos. Así mediante retención de los aldehídos del vino en resinas Lichrolut EN, limpieza de los mismos con solución acuosa-metanólica de NaHCO_3 e impregnación con disolución de O-(2,3,4,5,6, pentafluorobencil) hidroxilamina se obtienen las oximas correspondientes. Estas se eluyen con diclorometano tras lavado del exceso de reactivo con disolución de H_2SO_4 0,05 y pueden analizarse por cromatografía de gases con detección de masas o de ECD.

Como final de esta somera exposición de las técnicas de preparación de muestra más utilizadas deben señalarse las tendencias en cuanto al análisis y la instrumentación.

La utilización como estándares internos de isótopos de los compuestos a determinar sigue siendo el método más fiable en el análisis cuantitativo. Su mayor inconveniente, la dificultad de conseguir los patrones.

En cuanto a la instrumentación y en relación a la investigación de aromas, la cromatografía multidimensional, la cromatografía integrada, y el empleo de la Espectrometría de Masas de tiempo de vuelo ha abierto nuevas perspectivas que permitirán, a muy corto plazo, terminar de identificar todos los compuestos naturales responsables de los aromas del vino



Buscar soluciones es nuestro objetivo.
Porque hay gente esperando buenas
noticias.

Thermo Electron, líder en el suministro a laboratorios analíticos le ofrece soluciones adaptadas a sus necesidades. Desde la preparación de la muestra hasta la interpretación de resultados, podemos equiparle con la instrumentación más tecnológicamente avanzada. Desde una simple pipeta hasta un laboratorio completo, Thermo Electron dispone de los instrumentos y la tecnología necesaria para ayudarle. Visitenos en : www.thermo.com
en España : Tfno.-916574930 -Fax .-916574937
e-mail : comercial@thermo.es

Un líder en Ciencias de la Vida y Laboratorio

Thermo
ELECTRON CORPORATION