

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA  
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERS INDUSTRIALS DE  
BARCELONA

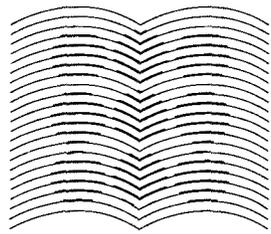
ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS  
ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA  
DE PIMENTÓN

MEMÒRIA PRESENTADA PER  
JOSEP MARIA GUADAYOL CUNILL  
PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR ENGINYER  
INDUSTRIAL

Dirigida per Josep Ribé Pons, Dr. Enginyer Industrial  
Codirigida per Josep Caixach Gamisans, Dr. en C. Químiques

Terrassa, juliol 1994

UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE CATALUNYA



BIBLIOTECA  
EX - LIBRIS

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA**  
**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERS INDUSTRIALS DE**  
**BARCELONA**

**ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS PARA LA**  
**DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS**  
**ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA**  
**DE PIMENTÓN**

**MEMÒRIA PRESENTADA PER**  
**JOSEP MARIA GUADAYOL CUNILL**  
**PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR ENGINYER**  
**INDUSTRIAL**

**Dirigida per Josep Ribé Pons, Dr. Enginyer Industrial**

**Codirigida per Josep Caixach Gamisans, Dr. en C. Químiques**

**Terrassa, juliol 1994**



**En memòria del meu pare**



# AGRAÏMENTS

---

Encara que pequi de poc original, començo per demanar disculpes a tot aquell que em pugui oblidar d'agrair-li la seva col·laboració en aquest treball. No hi ha cap ordre de preferència en les properes ratlles, només un sincer agraïment.

El Dr. Josep Ribé m'ha indicat el camí que havia d'anar seguint per desenvolupar aquesta tesi i arribar a bon port.

El Dr. Josep Caixach, que m'ha indicat tots els plantejaments per poder donar forma a les identificacions dels espectres de masses obtinguts, a part d'ajudar-me i donar-me els seus consells de manera continuada.

El Dr. Ramon Clotet m'ha orientat en la estructura de la Tesi, indicant-me con treballar amb els resultats obtinguts.

Haig de nombrar dues persones sense les que aquesta Tesi no existiria, l'Enric Botey i l'Albert Gavalrà, el primer va ser qui va tenir l'idea de treballar sobre aquest tema, obrint-me portes per informar-me, i sort que ha acabat prou bé. Sense l'ajut de l'Albert això no hauria pres la forma que té definitivament, ell m'ha orientat i m'ha fet anar pel camí més coherent.

Voldria continuar aquesta llarga llista citant en Carles Morillo, que sempre ha estat al meu costat en les realitzacions pràctiques, amb la discreció que el caracteritza, ajudant-me sempre, i traient-me de més d'un entrellat. Estic segur que, sense ell, la part experimental hauria estat encara més dura.

En Casimir Piqué ha fet els dibuixos amb els seus coneixement informàtics, posant-hi els cinc sentits per aconseguir la semblança més propera a la realitat, així com una simplificació que faciliti la comprensió per a tothom. També ha col·laborat amb l'edició dels originals.

En Txus Cabañas, del CID-CSIC, que també ha utilitzat els seus coneixements informàtics

## II

---

per poder presentar els espectres de masses i els cromatogrames amb una qualitat extraordinària, i pels seus coneixements d'espectrometria.

En Carles Forné ha col·laborat amb alguna instal·lació i ha aguantat totes les extraccions estoicament amb olors, sorolls i fred (la placa elèctrica produïa interferències amb la senyal cromatogràfica) inclosos, amb una paciència digna de tot respecte i admiració.

No m'ha faltat mai cap mostra per treballar, això ho puc agrair a l'Enric Balsells, d'ITPSA, que sempre me n'ha facilitat totes les necessàries, a part de oferir-me la informació adient, i així com a altres fabricants d'oleorresina de la província de Múrcia, com és el cas d'en Carmelo González, que també m'ha facilitat mostres.

També em va orientar molt en Francisco Collgrós, de Dallant S.A., que va donar-me uns consells molt valuosos sobre extracció.

La Teresa Baqueró va treballar amb tot el seu interès, aconseguint uns resultats que em van servir de molt.

Com a entitats, en primer lloc, haig de fer esment a l'Escola d'Enginyeria Tècnica Industrial de Terrassa, i dintre d'ella a la Secció Departamental d'Enginyeria Química, per deixar-me fer ús de tot el material que he necessitat, i que estava disponible a l'Escola, començant per l'adquisició del cromatògraf de gasos, que ha estat peça fonamental pel bon desenvolupament de la Tesi. Vull incloure a totes les persones que, puntualment, han col·laborat des de la seva pròpia feina, sense oblidar el servei de la Biblioteca, i els Serveis Informàtics.

Com a Entitat Pública hauria de seguir amb el Laboratori d'Espectrometria de Masses del CID-CSIC de Barcelona, sota la responsabilitat del Dr. Josep Rivera, que m'ha donat les màximes facilitats per aconseguir les anàlisis necessàries, així com aquells coneixements sobre matèries poc conegudes per mi. En aquest punt m'agradaria deixar constància d'un fet que considero molt important, i que és que m'hi he trobat com a casa, per això en aquest punt m'agradaria incloure a tots els col·laboradors d'aquest centre de recerca, que m'han tractat com a un més d'ells.

La meva esposa i la meva filla haurien de figurar aquí, encara que només fos per la paciència que han tingut amb tot això, però es que, a més, m'han ajudat en més d'un embolic.

Després de tota aquesta llarga llista recordo unes paraules d'en Toni Escalas, dient que això era una "Tesi coral", i la veritat és que cada vegada n'estic més convençut.

Gràcies a tots, de debò.

## ÍNDICE

---

# PRIMERA PARTE: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

## CAPÍTULO 1 EL PIMIENTO PARA PIMENTÓN

1.1	Introducción y aclaraciones semánticas .....	3
1.2	Orígenes del pimiento .....	4
1.3	Introducción del pimiento en España .....	4
1.4	Áreas de producción actuales .....	5
1.5	Características botánicas .....	6
1.6	Necesidades medioambientales .....	7
1.7	Recolección .....	7
1.8	Deshidratación de los frutos .....	8
1.9	Composición del pimiento .....	9
1.10	Aplicaciones del pimiento .....	10
1.11	Bibliografía .....	10

## CAPÍTULO 2 LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN

2.1	Definición y aplicaciones .....	11
2.2	Composición .....	12
2.3	Utilización .....	13
2.4	Elaboración industrial .....	13
2.4.1	Trituración, molienda y pelletización .....	14
2.4.2	Extracción .....	14
2.4.3	Elección del disolvente .....	14
2.4.4	Eliminación del disolvente .....	17
2.5	Características fisicoquímicas .....	18
2.6	Comentarios acerca de la extracción de la oleorresina de pimentón .....	19
2.7	Bibliografía .....	19

### **CAPÍTULO 3      LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES**

3.1	Introducción . . . . .	21
3.2	Generación de los aromas presentes en los alimentos . . . . .	23
3.3	Obtención (aislamiento) de los compuestos orgánicos volátiles . . . . .	23
3.4	Análisis mediante cromatografía de gases de los compuestos orgánicos volátiles . . . . .	24
3.5	Caracterización de los compuestos orgánicos volátiles separados mediante cromatografía de gases . . . . .	24
3.6	Acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas (HRGC/MS) para el análisis de los compuestos volátiles de la oleoresina de pimentón . . . . .	25
3.7	Bibliografía . . . . .	26

## **SEGUNDA PARTE:                      PLANTEAMIENTO DE TRABAJO**

### **CAPÍTULO 4      EXTRACCIÓN (AISLAMIENTO) DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOCs)**

4.1	La extracción de los compuestos orgánicos volátiles de los productos naturales. Métodos de extracción (o aislamiento) . . . . .	29
4.2	Destilación . . . . .	30
4.3	Extracción . . . . .	31
4.4	Destilación y extracción simultáneas (Método de Likens y Nickerson) . . . . .	32
4.5	Espacio de cabeza (Headspace) estático . . . . .	32
4.6	Espacio de cabeza (Headspace) dinámico . . . . .	35
4.7	Extracción supercrítica . . . . .	36
4.8	Bibliografía . . . . .	37

### **CAPÍTULO 5      SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES**

5.1	Separación de los componentes volátiles obtenidos mediante técnicas de extracción . . . . .	39
5.2	Identificación de los componentes volátiles mediante espectrometría de masas . . . . .	41
5.3	Referencias bibliográficas . . . . .	43

## **TERCERA PARTE: EXPERIMENTAL**

### **CAPITULO 6 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE DESTILACIÓN Y EXTRACCIÓN SIMULTÁNEAS A LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

6.1	El método de Likens y Nickerson aplicado a la extracción de los compuestos orgánicos volátiles de la oleorresina de pimentón (método a presión atmosférica) . . . . .	47
6.2	Equipo de extracción a presión atmosférica empleado experimentalmente . . . . .	49
6.3	Disolvente utilizado para la extracción . . . . .	50
6.4	Problemas durante el proceso de extracción . . . . .	51
6.5	Variables que influyen en la extracción (agitación magnética) . . . . .	51
6.6	Extracción de la muestra S-420 a presión atmosférica . . . . .	59
6.7	El método de Likens y Nickerson aplicado a la extracción de los VOCs de la oleorresina de pimentón (método a presión reducida) . . . . .	61
6.8	Extracción de la muestra S-420 a presión reducida . . . . .	62

### **CAPÍTULO 7 APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HEADSPACE ESTÁTICO A LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

7.1	Instrumentación . . . . .	65
7.2	Análisis cromatográfico de las muestras gaseosas obtenidas mediante headspace estático . . . . .	66
7.3	Desarrollo experimental . . . . .	67

### **CAPÍTULO 8 INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE HEADSPACE DINÁMICO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

8.1	Aplicación de las dos técnicas de headspace dinámico para la obtención (aislamiento) de los compuestos orgánicos volátiles de la oleorresina de pimentón . . . . .	73
8.2	Ensayos experimentales previos con distintos materiales adsorbentes . . . . .	73
8.3	Planificación para la experimentación de la técnica de headspace dinámico . . . . .	76
8.4	Bibliografía . . . . .	77

### **CAPÍTULO 9 LA TÉCNICA DE ARRASTRE Y ATRAPE (PURGE AND TRAP) APLICADA AL AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

9.1	Realización experimental . . . . .	79
-----	------------------------------------	----

9.2	Análisis cromatográfico de la extracción mediante la técnica de purge and trap . . . . .	81
-----	--	----

## **CAPÍTULO 10 LA TÉCNICA DE HEADSPACE DINÁMICO APLICADA AL AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

10.1	Realización experimental . . . . .	89
10.2	Análisis cromatográfico de la extracción mediante la técnica de headspace dinámico . . . . .	91

## **CAPÍTULO 11 SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

11.1	Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de los VOCs de la oleoresina de pimentón . . . . .	97
11.2	Identificación de los compuestos orgánicos volátiles. Condiciones de operación . . . . .	99
11.3	Cuantificación de los compuestos orgánicos volátiles . . . . .	100

# **CUARTA PARTE: DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## **CAPÍTULO 12 COMPARACIÓN DE LAS DISTINTAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN (AISLAMIENTO) DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

12.1	Consideraciones generales . . . . .	105
12.2	Destilación y extracción simultáneas . . . . .	106
12.3	Headspace estático . . . . .	109
12.4	Headspace dinámico . . . . .	110

## **CAPÍTULO 13 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

13.1	Introducción . . . . .	113
13.2	Extracción mediante el método de Likens y Nickerson a presión atmosférica . . . . .	114

13.3	Extracción mediante el método de Likens y Nickerson a presión reducida . . . . .	119
13.4	Extracción mediante el método de purge and trap . . . . .	124
13.5	Extracción mediante el método de headspace dinámico . . . . .	129
13.6	Extracción mediante el método de headspace estático . . . . .	129
13.7	Relación de compuestos orgánicos volátiles identificados en la oleorresina de pimentón . . .	134
13.8	Resumen de la relación entre los diferentes métodos de extracción y los volátiles identificados en cada uno de ellos . . . . .	136
13.9	Espectros de masas utilizados para la identificación de los VOCs de la oleorresina de pimentón . . . . .	139
13.10	Bibliografía . . . . .	184

## **CAPÍTULO 14      DISCUSIÓN SOBRE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES IDENTIFICADOS EN LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

14.1	Introducción . . . . .	185
14.2	Presencia, en otros alimentos, de los hidrocarburos identificados en la oleorresina de pimentón . . . . .	185
14.3	Presencia, en otros alimentos, de los alcoholes identificados en la oleorresina de pimentón .	195
14.4	Presencia, en otros alimentos, de los aldehídos identificados en la oleorresina de pimentón .	197
14.5	Presencia, en otros alimentos, de las cetonas identificadas en la oleorresina de pimentón . . .	204
14.6	Presencia, en otros alimentos, de los ácidos identificados en la oleorresina de pimentón . . .	207
14.7	Presencia, en otros alimentos, de los ésteres identificados en la oleorresina de pimentón . . .	211
14.8	Presencia, en otros alimentos, de las lactonas identificadas en la oleorresina de pimentón . .	212
14.9	Presencia, en otros alimentos, de las bases identificadas en la oleorresina de pimentón . . . .	212
14.10	Relación estadística de la identificación, en otros alimentos, de determinados VOCs identificados en la oleorresina de pimentón . . . . .	213
14.11	Comentario sobre la presencia de los volátiles de la oleorresina de pimentón en determinados alimentos . . . . .	239
14.12	Extracción de los compuestos orgánicos volátiles presentes en la cáscara de bola roja . . . . .	239
14.13	Procedencia de determinados volátiles en la oleorresina de pimentón . . . . .	240
14.14	Bibliografía . . . . .	242

## **CAPÍTULO 15      CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

15.1	Interpretación de los resultados obtenidos . . . . .	243
15.2	Cuantificación global de compuestos orgánicos volátiles de la oleorresina de pimentón . . . .	244

## QUINTA PARTE: CONCLUSIONES

### CAPÍTULO 16 CONCLUSIONES

16.1	Sobre los sistemas de extracción (aislamiento) de los VOCs de la oleoresina de pimentón . . . . .	249
16.2	Sobre los VOCs identificados en la oleoresina de pimentón . . . . .	250
16.3	Sobre la técnica HRGC/MS . . . . .	250
16.4	Sobre la extracción industrial . . . . .	250

---

**PRIMERA PARTE:  
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**



## **CAPÍTULO 1**

# **EL PIMIENTO PARA PIMENTÓN**

---

### **1.1 Introducción y aclaraciones semánticas**

En este capítulo se pretende ofrecer una visión del pimiento, con un tratamiento puramente agrícola y botánico, cuyo fin es únicamente informar sobre la materia prima que luego permite la obtención de la oleoresina de pimentón. Por su influencia en el estudio de los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) de la oleoresina, se incluye un subapartado que explica los métodos de deshidratación del pimiento. No se considera adecuada una profundización mayor sobre este tema, aunque debe tenerse en cuenta que cualquier variable de las que se indican puede tener influencia en el estudio de los volátiles.

La palabra pimentón es un aumentativo de pimiento y, entendiéndose como tal, el polvo que se obtiene al moler pimientos encarnados secos, también en algunas zonas se conoce como tal al pimiento fruto (según el Diccionario de la Real Academia Española).

También se encuentra la definición de pimentón como el polvo que se obtiene moliendo el pimiento colorado, después de seco, y que se emplea como condimento (según el Diccionario de Uso del Español de María Moliner).

Teniendo en cuenta los anteriores párrafos, se presenta una ambivalencia de la palabra pimentón, ya que se entiende como tal al fruto o al condimento, a lo que hay que añadir que en Murcia se entiende como tal a la planta que produce el pimiento para pimentón o pimiento pimentonero.

La tendencia actual se inclina por denominar pimentón al producto industrial elaborado como condimento, y a la planta y al fruto correspondiente como pimiento pimentonero o pimiento para pimentón respectivamente. Estas últimas denominaciones son las que se seguirán en adelante.

## 1.2 Orígenes del pimiento

Unánimemente se señala América del Sur como foco de origen del pimiento (se han hallado cáscaras de pimiento con más de 2.000 años de antigüedad en el Perú), desde donde se expandió al resto de América Central y Meridional. Asimismo no se ha encontrado ninguna referencia sobre esta planta en las lenguas antiguas del Viejo Mundo, lo que demuestra claramente su procedencia americana.

Se considera Méjico el centro fundamental del cultivo del pimiento *Capsicum annuum*. Otra especie de esta planta, el *Capsicum frutescens* se encontraba muy esparcida por toda la América tropical, tanto en forma silvestre como cultivada, esta última más significativa en Centroamérica. Otras especies de pimiento, en forma silvestre o cultivada, se difunden en amplias zonas tropicales y subtropicales de América, tal como sucede con el género *Capsicum*, que se encuentra en Sudamérica.

## 1.3 Introducción del pimiento en España

No hay una exposición clara de la responsabilidad de la introducción del pimiento en España, aunque existen algunas opiniones que indican una cierta iniciativa de los monjes Jerónimos, que poseían las semillas originarias del Nuevo Mundo, y las introdujeron en la comarca de La Vera (Cáceres), desde donde se trasladó a la Región de Murcia, a través del convento que poseía esta Orden en La Ñora.

Las simientes primitivas llegadas de América, proceden de un pimiento ligeramente alargado y picante, de carácter silvestre. Este pimiento, aunque no está demostrado científicamente, adquiere una forma más redondeada y un gusto menos picante, debido a las condiciones medioambientales de la Huerta de Murcia. El asentamiento definitivo del cultivo del pimiento en la Vega del Segura se produce en los primeros años de este siglo, extendiéndose por Santomera, Huerta de Murcia, Fortuna, etc., que se convierten en importantes centros de producción.

En los años cincuenta se producen unos sucesivos ataques de hongos en las plantaciones, lo que imposibilita el cultivo de pimiento, de tal manera que obliga que se traslade el mismo a dos grandes áreas: Campo de Cartagena y Valle de Guadalentín, en las que se riega con agua de pozo y no del Río Segura, que era la portadora de las zoosporas, responsables de los ataques fúngicos. La adaptación a estas nuevas tierras ha sido rápida, a pesar de presentar condiciones medioambientales distintas, que se manifiestan al obtener pimientos de calidades diferenciadas. Este cambio originó una disminución de la productividad, debido a que los terrenos son más pobres y las aguas más salinas; que, junto al importante factor del aumento de precio de la mano de obra, provoca una disminución de la rentabilidad del cultivo, lo que también produce una disminución en la competitividad en el mercado exterior. Actualmente, la zona murciana es la principal zona productora y exportadora de pimiento de España.

#### 1.4 Áreas de producción actuales

La producción de pimiento pimentonero en España se encuentra muy localizada en dos importantes zonas: La Región de Murcia y la comarca de La Vera en Cáceres. La suma de la superficie dedicada al cultivo del pimiento de las dos zonas anteriores supone el 90% del total cultivado en el país. Otras zonas productoras de escasa relevancia en España son: Badajoz, Alicante, Toledo, Albacete y Ávila.

La Región de Murcia presenta un clima de tipo mediterráneo subtropical, con características de marítimo en las zonas próximas a las costas. La pluviometría media es inferior a los 300 mm, dándose además valores altos de las temperaturas medias. En la zona del Campo de Cartagena se realizan cultivos relativamente resistentes a la salinidad. En la zona del Valle del Guadalentín, el suelo presenta mayor contenido en sales solubles, además de utilizar aguas de riego de mayor contenido salino, lo que aumenta la problemática del cultivo del pimiento pimentonero.

La comarca de La Vera, en Cáceres, presenta un clima de tipo mediterráneo húmedo-templado, con inviernos de temperaturas no inferiores a los  $-5^{\circ}\text{C}$  y veranos con temperaturas no superiores a los  $38^{\circ}\text{C}$ . La pluviometría es de 450 a 875 litros por  $\text{m}^2$  anuales. Las aguas son de salinidad media, por lo que los riegos no presentan problemas de alcalinización. Debido a las pocas horas de sol en la época de recolección del fruto, el secado se realiza al humo. Tanto por las condiciones climatológicas como por sus suelos, sus aguas y su secado, le hacen distinguirse de otros pimentones, y le confieren unas propiedades organolépticas diferentes a otros pimentones nacionales y extranjeros. A continuación, la tabla 1.1 presenta la distribución de la producción de pimiento en España, por provincias y Comunidades Autónomas:

Tabla 1.1 Producción de pimiento en España

La Rioja	6 ha
Catalunya	1 ha
Baleares	25 ha
Castilla-León	43 ha
Castilla-La Mancha	281 ha
C. Valenciana	193 ha
R. de Murcia	4.538 ha
Extremadura	2.376 ha
Andalucía	83 ha
España (total)	7.546 ha

## 1.5 Características botánicas

El pimiento pertenece al orden Tubliflora, dentro del que existen unas treinta familias, siendo las Solanáceas la que corresponde al pimiento. De sus diversas especies, más de la mitad pertenecen al género *Solanum*. Además del pimiento, la familia de las Solanáceas contiene un amplio grupo de plantas cultivadas de gran interés económico, como son la patata, el tomate, el tabaco, etc. La mayor parte de las variedades de pimiento cultivadas pertenecen a la especie *Capsicum annuum* L., por lo que es éste el nombre científico generalizado del pimiento. Si bien algunos autores reconocen únicamente la especie *C. annuum*, que engloba toda la variabilidad genética existente, otros autores distinguen dos especies *Capsicum annuum* L., y *Capsicum frutescens* L., que se diferencian fundamentalmente en el número y color de las flores, forma y tipo de frutos, duración vegetativa, etc.

El pimiento es una planta anual herbácea, con sistema radicular pivotante y profundo, que puede alcanzar una longitud de 70-120 cm, provisto y reforzado de un número elevado de raíces adventicias. El tallo es de crecimiento limitado y erecto. Cuando la planta llega a una cierta edad, los tallos se lignifican ligeramente. Presenta hojas lampiñas, enteras, ovales o lanceoladas con un ápice muy pronunciado y un peciolo largo. Las flores presentan una corola blanquecina, aparecen solitarias en cada nudo y son de inserción aparentemente axilar. Su fecundación es autógama.

Pochard ha demostrado que la aparición de flores funcionales en el pimiento está sometida a la acción de diversos factores, como el mínimo número de hojas (ocho a diez hojas por flor) y las condiciones de luz y temperatura favorables. El mismo autor ha emitido la hipótesis de que la aparición de una flor depende de un equilibrio entre una acción inductora que proviene de las hojas adultas y una acción represiva o competitiva procedente de las hojas jóvenes; por lo tanto, modificando este equilibrio se puede acelerar o retardar la floración. Bajo un punto de vista práctico, conviene favorecer los factores que permiten aumentar la proporción relativa de hojas adultas para acelerar la floración.

La fecundación depende de la marcha estacional. A temperaturas inferiores a 12°C, o superiores a 35°C, el grano de polen no germina. Si la fecundación de las flores no se realiza, éstas se desecan y caen. El tiempo transcurrido desde el cuaje del fruto y su maduración depende de las características del cultivo y del clima, más que de la variedad.

El fruto es una baya semicartilaginosa y deprimida de color rojo o amarillo, cuando está maduro, que se puede insertar perdular o enhiestamente, de forma y tamaño muy variable. Se puede indicar que existen variedades que producen frutos de 1 o 2 gramos, frente a otras que pueden formar bayas de más de 300 gramos.

Las semillas son redondeadas, suelen tener entre 3 y 5 cm de longitud, se insertan en una placenta cónica de disposición central siendo de color amarillo pálido. En 1 gramo puede haber entre 150 y 200 semillas, y su poder germinativo es de tres a cuatro años.

## 1.6 Necesidades medioambientales

La floración constituye el período crítico del pimiento, por lo que los factores ambientales determinan la mayor o menor floración, y de aquí, la futura producción. El pimiento es un cultivo de clima cálido, como ya se ha indicado, por lo que precisa calor, más necesitado que el tomate y algo menos que la berenjena. Para conseguir un desarrollo óptimo se precisan temperaturas diurnas entre 20-25°C, y nocturnas entre 16-18°C. Si las temperaturas superan los 32°C se produce caída de las flores, especialmente si se trata de ambiente seco. Si la humedad relativa es elevada, la planta tolera temperaturas superiores a los 40°C. Por debajo de los 15°C se retrasa el crecimiento de la planta, y si se desciende a los 0°C, la planta puede sufrir daños.

Las necesidades de temperatura del pimiento van creciendo a medida que se va desarrollando. No le son favorables los cambios bruscos entre el día y la noche; por esta razón, las zonas de menor variación térmica (zonas costeras reguladas por la proximidad del mar) favorecen los contenidos de bioelementos en la planta, lo que permite un mejor desarrollo, aunque la calidad del fruto es inferior a la que se obtiene en zonas que presentan una mayor variación térmica anual.

La semilla no germina por debajo de los 13°C, ni por encima de los 37°C, el mejor porcentaje de germinación se consigue entre los 20 y 30°C. La humedad ambiental es conveniente que se encuentre sobre el 50-70%, especialmente durante la floración y cuajado de frutos. Durante las primeras fases de desarrollo precisa y tolera una humedad relativa más elevada que en fases posteriores.

También se precisa luminosidad durante todo el ciclo vegetativo, de manera especial durante la floración, puesto que la escasa luminosidad la reduce. La falta de luz produce en la planta un cierto ahilamiento, con alargamiento de los entrenudos y de los tallos, lo que lleva a debilitarlos y no pueden soportar el peso de una cosecha abundante en frutos.

Finalmente, en lo que respecta al terreno de cultivo conviene indicar que la planta no se desarrolla bien en suelos arcillosos, siendo preferibles los de textura areno-limosa. En cualquier caso, el suelo debe drenar perfectamente, ya que si se produce un exceso de humedad se presenta asfixia radicular y se desarrollan enfermedades criptogámicas. El pH óptimo se encuentra entre 6,5 y 7. Es sensible a la salinidad del suelo, que influye negativamente sobre la calidad de la cosecha.

## 1.7 Recolección

Se realiza de dos formas: mediante obreros que se encargan de cortar los pimientos de las plantas, y también mecánicamente mediante cosechadoras. La maduración de los frutos acostumbra a ser escalonada, tanto por su aparición en los tallos como por la situación de los

mismos en el cultivo. Los frutos que se encuentran en zonas despejadas y soleadas acostumbran a adelantarse unos días en su maduración a aquellos que se encuentran a la sombra o cubiertos por una masa de hojas que no permite penetrar a la luz.

El rendimiento suele ser de 4.000 a 5.000 kg de cáscara (pimiento abierto y desecado) por hectárea, lo que equivale a unos 25.000 a 30.000 kg de pimiento fresco. La recolección se realiza durante los meses de septiembre, octubre, noviembre y diciembre.

A medida que aumenta la maduración aumenta paralelamente el contenido en materia seca del pimiento, asimismo también aumenta su color, lo que induce a recolectarlos totalmente maduros.

Hay que destacar que la síntesis de colorantes carotenoides del pimiento tiene dos fases: la primera durante el crecimiento y la segunda durante la maduración. Hay que tener en cuenta que durante la postmaduración existe una síntesis de colorantes que se puede producir en la misma planta o después de la recolección. Se han realizado multitud de ensayos para valorar las condiciones que permiten un mejor contenido en color; no debe olvidarse que la valoración final será el contenido en color.

## **1.8 Deshidratación de los frutos**

Las plantas recién recolectadas contienen una cantidad de agua importante, que depende de las distintas partes de las mismas. Si el contenido de agua es importante, pueden proliferar ataques de bacterias y hongos; por ello interesa eliminar el agua lo más rápidamente posible. Para la transformación industrial se precisa desecar el pimiento y obtener la cáscara seca, incluyendo las semillas. Los métodos a seguir son los siguientes:

- Desecado por exposición al sol.
- Desecado al sol bajo cubiertas de plástico.
- Desecado al humo.
- Desecado mediante aire caliente.

Hay que tener presente que la temperatura crítica del pimiento se encuentra entre 65 y 75°C. Si se supera este intervalo comienzan a producirse alteraciones organolépticas importantes, ya que se favorecen los fenómenos de oxidación y otros tipos de reacciones químicas entre los propios componentes del pimiento. El efecto más importante de la degradación por temperatura consiste en la destrucción de colorantes rojos y amarillos naturales y el aumento de pigmentos pardos que producen un aspecto poco deseable. Se describen someramente las características más importantes de los sistemas mencionados antes.

La técnica de **desecado al sol** se emplea mucho en la Región de Murcia, debido a que se ve favorecida por la climatología. Para ello los pimientos se extienden en explanadas de cemento

para que, bajo la acción directa del sol, vayan siendo deshidratados. Resulta una técnica barata, además de conseguir que la cáscara adquiriera más color que en los otros tipos de desecado. Los pimientos se dejan al sol el mismo día de su recolección, extendidos sobre eras, en una capa de unos 10 cm de espesor. Se acostumbra a dejarlos unos 10 días al sol. Después se parten mecánicamente por la mitad y se vuelven a colocar al sol durante 2 o 3 días, pero formando una capa de unos 5 cm de espesor. Después del secado se puede quitar o no el rabo o pedúnculo, lo que encarece el precio de venta de la cáscara seca. El sistema de desecado al sol bajo cubiertas de plástico sustituye al desecado al sol en aquellas zonas en que las condiciones climatológicas no lo permiten. Siendo muy ventajoso, no es muy utilizado, ya que resulta ser caro por la instalación que precisa.

El **desecado al humo** se realiza únicamente en la comarca de La Vera, y consiste en colocar los pimientos en un horno, en cuya parte inferior se coloca la leña (generalmente de encina o de roble). Se enciende la leña y produce un humo que es el que deshidrata al pimiento, dándole un color más oscuro. Es importante resaltar la acción fungicida que produce el humo en los frutos. El tiempo de secado dura entre 8 y 10 días. Los pimientos más maduros son los que tardan menos tiempo en secarse. Se precisa 0,8 kg de leña por cada kg de pimiento fresco.

El pimiento es uno de los productos hortícolas que tolera mejor un **desecado por aire caliente**, ya que presenta cierta resistencia a las alteraciones por calor, dentro de unos límites de temperatura. Se precisa un fruto que haya alcanzado el máximo grado de madurez. El contenido en agua al salir del secadero debe ser de un 10%; ya que, para disminuirla más, son precisos unos gastos de energía y de tiempo inútiles. Existen diversos tipos de secaderos por aire, con diseños característicos para optimizar al máximo su función.

## 1.9 Composición del pimiento

La composición química de los frutos del *Capsicum* varía bastante según la variedad considerada, las condiciones en las que se ha cultivado, etc. Sin embargo, se puede indicar un ejemplo que permite adquirir una idea general:

Tabla 1.2 Composición aproximada del pimiento

<i>Humedad</i>	8,34%
<i>Substancias nitrogenadas</i>	15,75%
<i>Materias grasas</i>	10,39%
<i>Extracto no nitrogenado</i>	42,86%
<i>Celulosa</i>	15,37%
<i>Cenizas</i>	6,02%
<i>Aceites esenciales</i>	1,18%

El fruto contiene una pequeña cantidad de aceites esenciales, a los que debe su olor, también contiene diversos pigmentos y un alcaloide: la capsaicina. Los pigmentos ocupan el lugar más importante, ya que el pimiento es el principal colorante rojo en la alimentación humana. Dichos pigmentos están constituidos por una asociación de carotenoides entre los que se encuentran la capsantina, capsorrubina, zeaxantina, criptoxantina, luteína y carotina. También son ricos en vitamina C, o ácido ascórbico, encontrándose otras vitaminas como la A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, E, J y PP.

### 1.10 Aplicaciones del pimiento

Considerando que es una fuente rica en vitamina C, puede utilizarse como condimento, siendo muy popular como aditivo para dar color a ciertos alimentos, como los huevos, el queso y las patatas. Comercialmente, el pimiento se utiliza para la fabricación de salchichas y embutidos. También se utiliza como conservante natural por sus propiedades antibacterianas.

El "chilli" es una mezcla de pimiento y otras hierbas y especias, utilizándose en diversos guisos mexicanos. También forma parte del "curry", y es el condimento esencial del "goulash" húngaro. Sin embargo, la principal aplicación del pimiento es la obtención de oleorresina.

### 1.11 Bibliografía

- [1] J.V. MAROTO. *Horticultura Herbácea Especial*.(1989).
  - [2] UNE 34 029. "Pimentón" (4/1/93).
  - [3] ZAPATA, BAÑÓN Y CABRERA. *El pimiento para pimentón*. Agroguiás Mundi-Prensa. (1992).
-

## CAPÍTULO 2

# LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN

---

### 2.1 Definición y aplicaciones

Según el código alimentario, las oleorresinas se incluyen entre los agentes aromáticos y se definen como "productos obtenidos de los condimentos aromáticos o especias y otros productos vegetales por un proceso de extracción y posterior eliminación del disolvente". Así pues, la oleorresina de pimentón es el extracto lipídico del mismo, obtenido en forma de aceite viscoso con un intenso color rojo y con el aroma típico del pimiento, que contiene todos los componentes de dicho producto extraíbles mediante un disolvente orgánico.

La importancia de la oleorresina de pimentón se debe, fundamentalmente, a su poder colorante. Dado que se trata de un producto natural atóxico, se emplea en gran medida en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica, etc., en sustitución de otros aditivos de síntesis que pueden resultar tóxicos a largo plazo. Las sustancias que confieren el color, carotenoides y xantófilas (derivados cetónicos o con grupos hidroxilo de los carotenos), se encuentran en los cromatóforos de las plantas, por lo general en suspensión coloidal.

La comercialización del pimentón como oleorresina presenta unas ventajas que justifican la transformación:

- Los pigmentos carotenoides están más protegidos frente a la oxidación atmosférica y frente a la luz.
- La dosificación se controla más fácilmente.
- Debido a ser un producto que presenta mayor concentración, requiere menor espacio para su almacenamiento, a la vez que disminuyen los costes por transporte.
- Está libre de contaminaciones microbiológicas, restos de insectos, etc.

- Se consigue una gran estabilidad del color, pese a la estructura insaturada de las moléculas de los pigmentos colorantes.

## 2.2 Composición

Los componentes químicos de la oleorresina de pimentón son los siguientes:

- Ácidos grasos esterificados: Palmítico, esteárico, oleico, linoleico, mirístico, etc.
- Esteroles y esteroides.
- Vitamina E: procedente del germen de la semilla.
- Pigmentos carotenoides:

Colorantes rojos: capsanteno y capsorrubeno.

Colorantes pro-vitamínicos amarillos: criptoxanteno y  $\beta$ -caroteno.

Otros colorantes amarillos: zeaxanteno, luteína y violaxanteno.

En una oleorresina que presente 100.000 unidades de color, el contenido aproximado de los carotenoides típicos está indicado en la tabla 2.1.

Tabla 2.1 Contenido en carotenoides de una oleorresina de pimentón de 100.000 unidades de color

<i>Carotenoides típicos</i>	<i>Contenido en g/kg</i>
<i>Capsanteno</i>	<i>65-70</i>
<i>Capsorrubeno</i>	<i>8,5-9</i>
<i><math>\beta</math>-caroteno</i>	<i>12-12,5</i>
<i>Zeaxanteno</i>	<i>8-8,5</i>
<i>Criptoxanteno</i>	<i>3,5-3,7</i>
<i>Violaxanteno</i>	<i>0,5-1</i>
<i>Car. Isomerizados</i>	<i>0,8-1</i>

Es importante señalar que algunos de estos pigmentos son de naturaleza pro-vitamínica, de tal forma que en el organismo humano pueden transformarse en vitamina A después de su ingestión alimenticia.

### 2.3 Utilización

Ya se ha indicado su aplicación dentro de tan diversas ramas como son alimentación, cosmética y farmacéutica. Dentro de la alimentación cabe destacar la humana y la animal. Respecto a esta última hay que decir que en España y otros muchos países el consumidor exige aves pigmentadas. Una pigmentación correcta, además de ser un aspecto atractivo para el comprador, se considera también un índice de salud, ya que es bien conocida la influencia que tienen sobre la pigmentación los trastornos y enfermedades de la aves. Salud y color son dos conceptos ligados a una gran inquietud actual por la alimentación, y en este caso, pigmentación natural.

El color de la yema de huevo, así como el de la carne de pollo, se produce por la acumulación de ciertos pigmentos naturales en los tejidos, estos pigmentos son los carotenoides. La principal fuente de carotenoides en la alimentación aviar es el maíz, pero cuando la coloración baja o se desea incrementar, se utiliza la oleorresina de pimentón mezclada con el pienso.

En el caso de la alimentación humana se aplica a carnes, productos lácteos, sopas, comidas ligeras y en general a productos que precisan este tipo de color.

### 2.4 Elaboración industrial

Sin intentar profundizar excesivamente en este tema, se desea dar una visión general de la obtención de la oleorresina de pimentón, puesto que presenta gran influencia dentro de este trabajo.

Su elaboración consta de las siguientes etapas:

- El **triturado y molido de la cáscara**, previamente seca, permite la obtención del polvo de pimiento, que se prepara en pellets (normalmente de forma cilíndrica).
- La **extracción de los pellets** mediante un disolvente orgánico adecuado, en la que tiene lugar la disolución de los componentes liposolubles del pimentón.
- La **eliminación del disolvente** a una temperatura no superior a los 50-60°C, con la ayuda de vacío. Finalmente se inyecta vapor para eliminar el disolvente residual, y conseguir adaptarse a la legislación vigente.

El fruto deshidratado que entra en la fase de extracción presenta una composición media del 55 al 62% de pericarpio; del 29 al 33% de semilla y del 8 al 9% de pedúnculos. Todo el contenido de color se encuentra en el pericarpio, con lo que es conveniente eliminar previamente la semilla, que se tratará para la extracción de su aceite, utilizado para

estandarizar el color final de la oleoresina.

#### **2.4.1 Trituración, molienda y pelletización**

Sigue una trituración y molienda del pericarpio hasta conseguir el tamaño deseado que permita una mejor extracción, lo que se consigue realizando una pelletización que permite la difusión del soluto entre las dos fases sólido-líquido. El pellet debe presentar una forma geométrica que, con el mínimo volumen presente la máxima superficie, lo que favorece el fenómeno de la extracción. Es recomendable la forma cilíndrica debido a que cumplen, con bastante aproximación, los requisitos de la relación superficie/volumen, siendo además una forma muy extendida en las granuladoras existentes en el mercado. Es conveniente controlar la humedad para conseguir una buena extracción.

#### **2.4.2 Extracción**

Hay diversos factores que influyen en la extracción:

- La agitación favorece el contacto íntimo entre el sólido y el disolvente, renovando la superficie de transferencia sólido-líquido.
- El disolvente debe ser selectivo, y que se desplace con facilidad a través del sólido.
- La temperatura, al aumentar, influye positivamente en la extracción, aumentando la solubilidad y el coeficiente de difusión del soluto en el disolvente, aunque puede disminuir la selectividad del mismo.

#### **2.4.3 Elección del disolvente**

Las pruebas realizadas con distintos disolventes mediante extracción discontinua durante doce horas (Cabeza et al., 1992) se muestran en el diagrama de barras que se presenta en la figura 2.1.

De la figura mencionada y de la propia naturaleza de los disolventes pueden deducirse las siguientes valoraciones:

- La mayor densidad de ciertos disolventes hace que los pellets floten, de tal manera que se obtiene un rendimiento inferior en la extracción, como ocurre en el caso del dicloroetano.
- El disolvente empleado no debe perjudicar la valoración en color de la oleoresina,

lo que no aconseja el empleo de etanol.

- Los disolventes clorados presentan el problema del coste a manipular, ya que la operación de extracción, por ser un fenómeno de superficie, está influenciada por el volumen. Además presentan un elevado punto de ebullición, con el consiguiente aumento de coste energético.
- Otros disolventes, tales como el éter de petróleo, éter etílico y acetona, aunque presentan unos rendimientos muy aceptables, generan problemas de inflamabilidad. Todo ello conduce a elevadas pérdidas de disolvente, mayor coste de seguro y un aumento de la peligrosidad. Contrariamente al caso de los disolvente clorados.
- Debe tenerse en cuenta las normas vigentes sobre el empleo de diversos disolventes en productos destinados al consumo humano o animal.

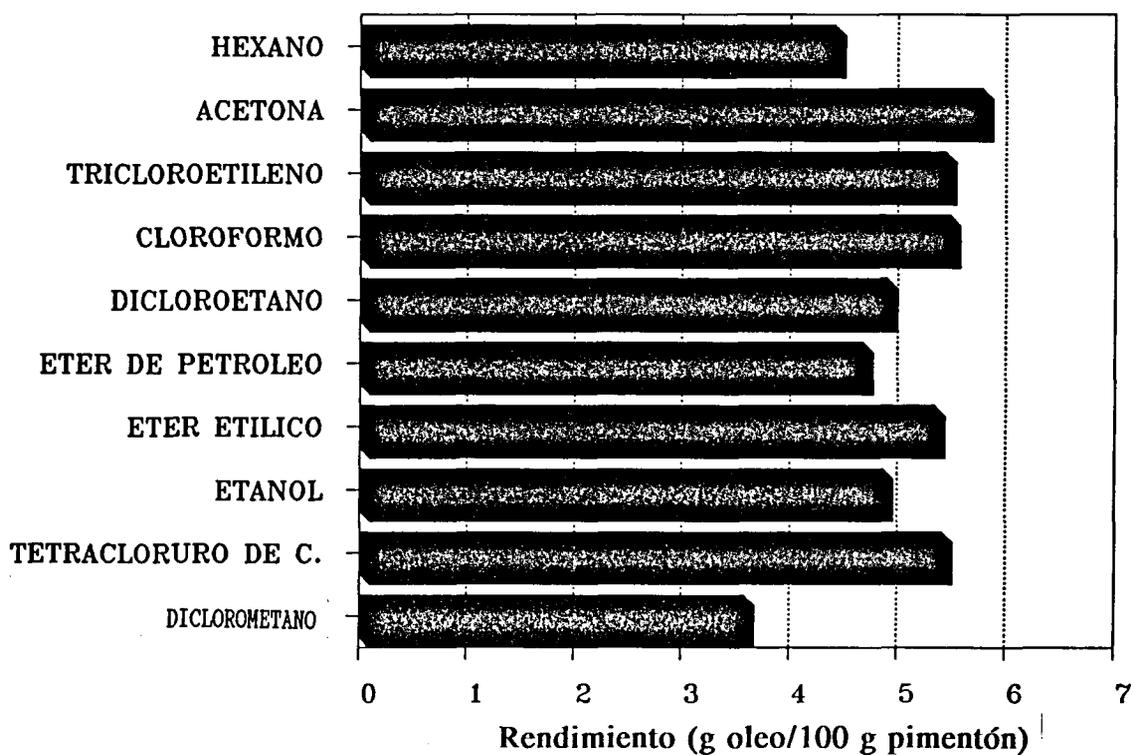


Figura 2.1 Rendimiento de la extracción utilizando diferentes disolventes.

Teniendo en cuenta las anteriores valoraciones, el disolvente que mejor se ajusta a las necesidades industriales para la obtención de la oleorresina de pimentón es el hexano. Dicho disolvente puede presentarse como n-hexano y hexano (con todos sus isómeros). Se ha comprobado (Cabeza et al., 1992) que no hay diferencias importantes en su comportamiento, a efectos de extracción. No debe olvidarse que los intereses que mueven a la elección del

disolvente son los puramente industriales.

La figura 2.2 presenta la curva rendimiento-tiempo de extracción sin agitación. De ella se desprende que, en una extracción discontinua en una etapa, disminuye mucho el rendimiento a partir de las cuatro horas, ya que, para aumentarlo un 0,2%, se precisa que el proceso dure una hora más.

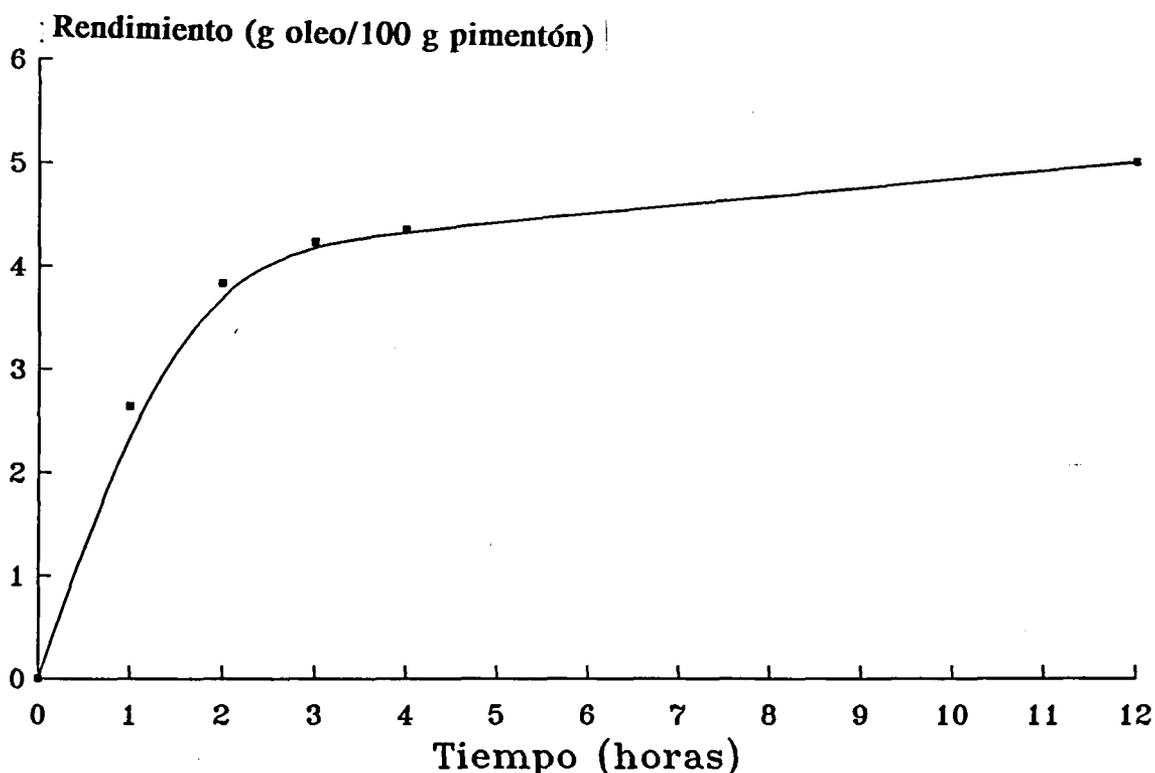


Figura 2.2 Rendimiento de la extracción frente al tiempo de duración de la misma.

La figura 2.3 presenta los resultados para la extracción con más de una etapa. Para confeccionarla se ha procedido de la siguiente forma: El primer valor representa el contacto de los pellets con el disolvente durante cuatro horas. Para el segundo valor los pellets han estado una hora en contacto con el disolvente nuevo, el cual se ha renovado para las tres horas restantes. El tercer valor se halla cambiando el disolvente a las tres horas. De todo ello se desprende que un cambio de disolvente favorece positivamente el rendimiento de la extracción, y que dicho cambio debe realizarse alrededor de la primera hora de extracción.

Los estudios indicados hasta el momento se encuentran ampliados (Cabeza et al., 1992), de tal manera que lo presentado en este apartado es únicamente el resumen de lo más importante bajo el punto de vista de su influencia sobre los compuestos volátiles de la oleoresina de pimentón, no se pretende introducir ninguna consideración sobre su bondad en los métodos en uso actualmente.

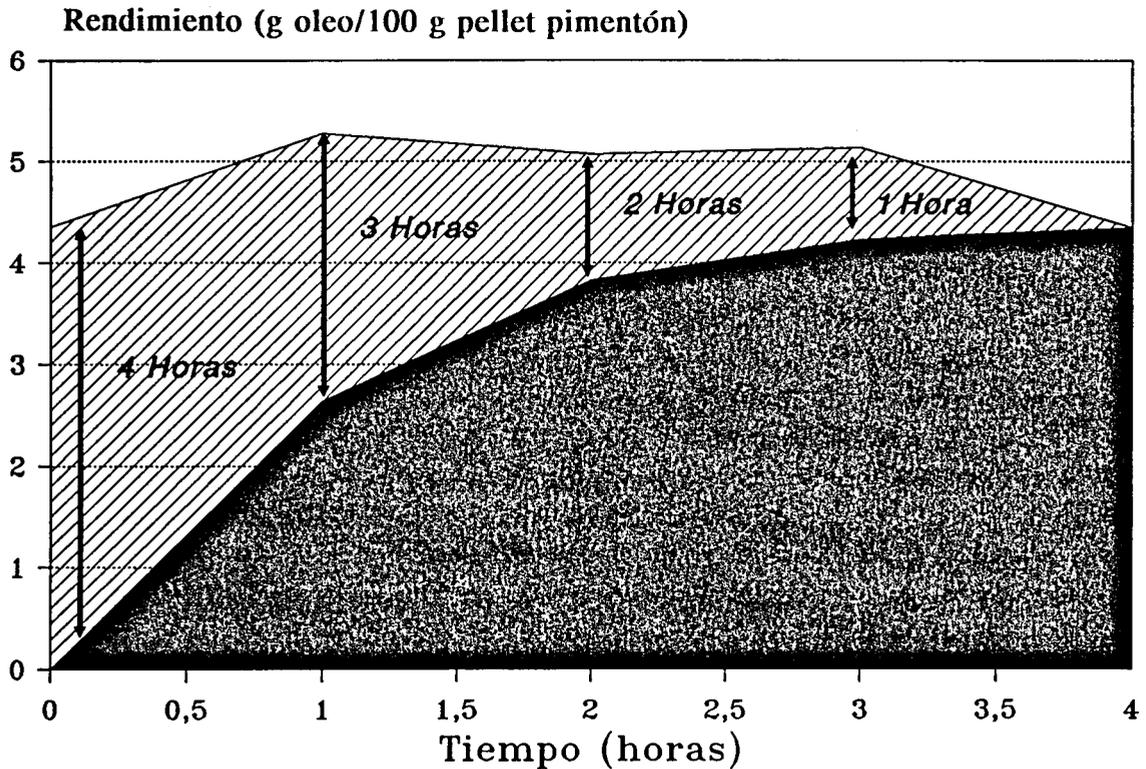


Figura 2.3 Resultados de la extracción con más de una etapa.

#### 2.4.4 Eliminación del disolvente

Se acostumbra a eliminar el disolvente por evaporación, con aplicación de un vacío elevado al final de la destilación, aún con este sistema quedan entre 5.000 y 10.000 ppm de moléculas de disolvente, debido a que son retenidas fuertemente por las macromoléculas de los triglicéridos, etc.

Por lo dicho antes, es conveniente aplicar un arrastre con vapor de agua en el mismo equipo de desgasificación o desolventización, con lo que se puede llegar a un contenido de 5 ppm de disolvente. Debido a que el contenido de la oleoresina de pimentón en los alimentos es muy pequeño, no se presenta ninguna toxicidad, al disminuir considerablemente la proporción del mismo.

El empleo de dicloroetano como disolvente está soportando unas restricciones debidas a las causas indicadas anteriormente, lo que hace que las plantas de extracción se estructuren hacia la utilización del hexano. Existe otro inconveniente en el empleo de dicloroetano, derivado

de su descomposición, en pequeño porcentaje, al sufrir la destilación y eliminación del mismo, se descompone en ácido clorhídrico y agua.

Hay que indicar que los estudios actuales se dirigen hacia la extracción de oleoresina mediante el empleo de fluidos supercríticos, normalmente el anhídrido carbónico. Las distintas condiciones de trabajo, variando la temperatura y la presión pueden dar lugar a extracciones en las que la fracción extraída se podrá variar en función de las condiciones indicadas antes (Domènech et al., 1977). Es muy posible que con la aplicación de esta técnica se eviten los diversos problemas indicados anteriormente.

## 2.5 Características fisicoquímicas

Se indican, de forma muy general, las propiedades fisicoquímicas más importantes que presentan las muestras de oleoresina de pimentón que se han utilizado en este trabajo:

- Color rojo oscuro: La intensidad de color es su cualidad más importante desde el punto de vista comercial y depende de la concentración de los pigmentos que contiene.
- Aroma agradable, característico del pimiento.
- Sabor agradable y dulce.
- Fluidez relativamente alta.
- Homogeneidad.
- Muy soluble en aceites vegetales a temperatura ambiente, para proporcionarles una coloración roja, brillante y transparente.
- Libre de materias extrañas.
- Humedad inferior al 0,5%.
- Disolvente residual: Se ha indicado que la legislación actual ha reducido mucho las tolerancias máximas, lo que ha disminuido aún más los contenidos en ppm de los disolventes.
- La densidad es un valor variable, aunque oscila entre 0,92 y 0,95 gr/ml.
- Solubilidad: La oleoresina es perfectamente soluble en aceites y grasas, y puede prepararse de forma dispersable en agua con la presencia de determinados

emulsionantes no iónicos permitidos en alimentación.

## 2.6 Comentarios acerca de los métodos de extracción de la oleorresina de pimentón

Se ha visto que, actualmente, el sistema de extracción vigente se realiza mediante disolventes volátiles, lo que supone la eliminación de los mismos mediante la aplicación de calor, vapor de agua y vacío.

Todas las técnicas de eliminación del disolvente indicadas en el párrafo anterior son negativas a efectos de mantener los compuestos orgánicos volátiles en la matriz de la oleorresina. Hay que tener presente que gran cantidad de los mismos se pierden en las operaciones indicadas. Aún así se podrá observar que todavía quedan retenidos por la oleorresina gran cantidad de los mencionados compuestos.

Aunque la finalidad actual de la oleorresina de pimentón es la de colorante, se puede pensar en que la aplicación de la extracción supercrítica disminuirá de forma drástica la pérdida de volátiles de la oleorresina, lo que le conferirá propiedades organolépticas superiores a las que presenta actualmente (Domènech et al., 1977).

## 2.7 Bibliografía

- [1] C. BENNASAR, ROSAURA FARRÉ. "Estudio analítico de la oleorresina de pimentón". *Anal. Bromatol.* XXVIII-1 (1976) 45-56.
  - [2] A. CABEZA MARTÍN, J.M. GUADAYOL CUNILL, E. BALSELLS PRATS. "Optimización de la obtención de oleorresina de pimentón por extracción mediante disolventes volátiles". Comunicación presentada en el II Congreso Internacional de la ANQUE, Burgos, octubre 1992.
  - [3] M. DOMÈNECH, R. FARRÉ, M<sup>a</sup> C DE LA TORRE. "La estabilidad de la oleorresina de pimentón". *Anal. Bromatol.* XXIX-4 (1977) 461-482.
  - [4] F. NAVARRO, J. COSTA. *La oleorresina de pimentón*. Dpto. Química-Física, Universidad de Murcia. Consejería de Agricultura CRIA-La Alberca (Murcia).
  - [5] P. SALMERÓN, F. ROMOJARO. "Estudio sobre la obtención de oleorresina del pimentón (*Capsicum annum*)". *A.T.A.*, 15 (1975) 560-572.
  - [6] R. SEGURA FERNS. "Métodos de extracción de oleorresinas de pimiento". *Galénica Acta*, XIII, 4, 381-95.
  - [7] "Reglamentación técnico-sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción". *BOE*, 280 (1990) 34605-34611.
-



## CAPÍTULO 3

# LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES

---

### 3.1 Introducción

Desde los tiempos más antiguos los compuestos orgánicos volátiles de las plantas (VOCs) han tenido un peso específico considerable en relación con el aroma y el olor. El período durante el cual los VOCs naturales aislados de plantas se usaron como materia prima de perfumería y alimentación duró hasta mediados del siglo pasado. Comprendían un centenar, aproximadamente, de aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor, algunas oleorresinas obtenidas por extracción con disolventes, unos diez resinoides y algunos productos procedentes del reino animal.

Actualmente, los VOCs obtenidos de las plantas continúan jugando un importante papel como productos naturales olorosos y sirven, además, como modelos para síntesis químicas de sustancias que pretenden ser idénticas a las naturales, con características muy pronunciadas de olor y sabor.

En 1963, Weurman publicó una lista de compuestos volátiles, constituida por, aproximadamente, un centenar de compuestos, treinta años después la lista contiene un mínimo de 5.000 compuestos químicos. Los compuestos aromáticos volátiles representan, aproximadamente, entre 10 y 100 ppm del total de la planta.

Los compuestos olorosos o aromas son moléculas orgánicas de masa molecular no muy elevada, inferior a 400; y cuya tensión de vapor a presión atmosférica y a temperatura ambiente es lo suficientemente alta como para que se encuentren parcialmente en estado de vapor en la atmósfera, provocando un estímulo en la mucosa olfativa.

Los compuestos volátiles citados antes pertenecen a diversos grupos de la química orgánica: hidrocarburos (generalmente terpénicos), alcoholes, éteres, aldehídos, cetonas, ésteres, aminas, amidas y diversos heterociclos. Ninguno de ellos aporta valor nutritivo alguno al

alimento que los contiene.

Por lo visto anteriormente, un aroma natural representa una parte ínfima respecto al producto alimentario en el que se encuentra. De cualquier forma, es conveniente tener en cuenta las siguientes premisas (Richard, Giampoali, 1992):

- La nota aromática típica de un producto alimentario se debe, a veces, a un único compuesto, por ejemplo el caso del 1-octen-3-ol del champiñón.
- Pueden ser necesarios diversos compuestos para dar la idea de un alimento. En ocasiones intervienen un pequeño número de moléculas, como en el caso de la manzana. Otras veces es necesaria la combinación de un mayor número de compuestos, como en el caso del melocotón.
- Ninguno de los compuestos volátiles identificados en el alimento parece aportar la nota característica, caso de la pimienta.

Los diversos compuestos volátiles de un producto alimentario se perciben de dos maneras diferentes: en primer lugar, por vía nasal directa; luego, cuando el alimento está en la boca, por vía retronasal. Ambas percepciones definen perfectamente el olor y el aroma del producto, que reagrupadas con astringencia y pseudocalor (sensación de cambio de temperatura de la boca provocada por ciertos alimentos), reciben el nombre de flavor.

No se detecta un compuesto volátil en la atmósfera circundante si no se alcanza su umbral de detección. Según el compuesto de que se trate se presentan umbrales de percepción distintos, que dependen también del medio en que se encuentran. Se incluye la tabla 3.1 que permite comparar los umbrales de detección de diferentes compuestos orgánicos volátiles constituyentes de aromas, y así poder comparar su distinto poder, los umbrales de detección están en ppm, la tabla es válida para agua a 20°C.

Tabla 3.1 Umbrales de detección de diferentes compuestos orgánicos volátiles

<i>Etolol</i>	<i>100</i>	<i>Maltol</i>	<i>35</i>
<i>Ácido butírico</i>	<i>0,2</i>	<i>Vainillina</i>	<i>0,02</i>
<i>Linalol</i>	<i>0,006</i>	<i>α-Ionona</i>	<i>0,004</i>
<i>2-Isobutil-3-metil pirazina</i>	<i>0,000002</i>	<i>Metilmercaptano</i>	<i>0,00002</i>
<i>Furaneol</i>	<i>0,00004</i>	<i>1p-Menten-8-tiol</i>	<i>0,00000002</i>

Se observa en la tabla que el umbral de detección de una substancia varía mucho con respecto a otras. La anterior tabla se ha incluido meramente a título informativo, sin que los

compuestos orgánicos volátiles indicados tengan que ver con la oleorresina de pimentón.

### 3.2 Generación de los aromas presentes en los alimentos

Se puede considerar que los aromas que se encuentran presentes en los alimentos se generan a través de los tres métodos siguientes (Katz, 1986):

1. Productos aromáticos derivados biológicamente, también llamados metabolitos secundarios. Generalmente se forman por los siguientes motivos:
  - a.- fermentación microbiológica;
  - b.- acción enzimática de enzimas endógenos;
  - c.- enzimas adicionados durante el proceso;
  - d.- productos finales del metabolismo de las plantas.

Como ejemplo de este grupo se encuentran los vegetales, frutas, bayas, aceites esenciales, productos lácteos fermentados y bebidas alcohólicas.

2. Productos aromáticos formados por aporte de calor, que se producen cuando el alimento se cocina o se procesa con aporte calorífico. Son los responsables del aroma de los alimentos tales como carne, café, aves de corral y productos similares.
3. Productos aromáticos formados por aporte de calor, pero que dependen de la formación de precursores durante una etapa previa de fermentación. Como ejemplos típicos pueden citarse el cacao y el pan. Los productos no volátiles formados durante fermentación microbiológica reaccionan según la reacción de Maillard para formar los responsables químicos del aroma.

### 3.3 Obtención (aislamiento) de los compuestos orgánicos volátiles

Partiendo de la base de que se trata de sustancias que producen olor y/o sabor, presentan una volatilidad elevada, como indica su nombre. Ello permite aplicar técnicas que consiguen separarlos de la matriz que los contiene.

Como se verá en el siguiente capítulo, existen muchos métodos de extracción de los mismos, pero no todos ellos aplicables a la oleorresina de pimentón. No hay que olvidar que no se trata de un aceite obtenido por arrastre de vapor, lo que facilitaría mucho el procedimiento, sino de una oleorresina, que contiene sustancias de elevada masa molecular, y por tanto, de baja volatilidad.

Se presenta el problema de la formación de compuestos extraños, debido a descomposiciones químicas o reacciones entre volátiles durante el proceso de separación. En ocasiones, como

en este estudio, se adicionan cuerpos extraños para la extracción que pueden proporcionar sustancias extrañas, indicadas antes. Por todo ello cualquier adición para mejorar una extracción debe controlarse adecuadamente.

En el presente estudio se ha evitado añadir cualquier cuerpo extraño durante los procesos de separación de los volátiles, aunque alguna técnica aplicada ya lleva implícita la utilización de disolventes, etc.

### **3.4 Análisis mediante cromatografía de gases de los compuestos orgánicos volátiles**

La cromatografía de gases, pese a sus limitaciones, es la mejor técnica de separación para la situación en estudio que se presenta. La limitación más considerable que presenta su aplicación es que está restringida a la separación de compuestos que poseen una considerable presión de vapor, o sea una cierta volatilidad. La volatilidad es, sin embargo, el atributo fundamental que presentan aquellas sustancias que aportan aroma.

El flavor es la respuesta de una suma de estímulos, mientras que la cromatografía de gases diferencia únicamente a varios de estos compuestos presentes, solamente a algunos de los que aportan sus propiedades al flavor.

Las muestras de flavor son, a menudo, demasiado complejas, alguno de sus compuestos es inestable, y pueden encontrarse dispersos en diversas matrices, todo ello puede complicar su obtención para el análisis.

Se precisa el uso de columnas de gran capacidad de resolución. Por lo general, la resolución de una separación varía inversamente con la capacidad de la columna (Takeoka et al., 1985), las mejores separaciones se obtienen en las columnas de diámetros más pequeños. La disminución del diámetro de una columna presenta el problema de la adaptación de la misma a los equipos de inyección y detección existentes.

### **3.5 Caracterización de los compuestos orgánicos volátiles separados mediante cromatografía de gases**

Si bien se dispone de la espectrometría de masas para dilucidar la naturaleza de los compuestos orgánicos volátiles, es posible pensar en algún método para caracterizar los mencionados compuestos (Sandra, Bicchi, 1987). El tiempo de retención varía con la temperatura y con el caudal de gas portador, por lo que hay que descartarlo debido a la imposibilidad de mantener estas condiciones constantes en cada experiencia.

La **retención relativa** es la relación entre un componente determinado y otro que se utiliza como referencia:

$$r_R = \frac{t_{R(\text{analito})}}{t_{R(\text{standard})}}$$

En ocasiones es más estricto utilizar la relación entre tiempos de retención ajustados a una sustancia que no es retenida prácticamente por la columna, con lo que la anterior fórmula se transforma en:

$$r_{(a,s)} = \frac{t'_{R(a)}}{t'_{R(s)}} = \frac{t_{R(a)} - t_M}{t_{R(s)} - t_M}$$

En la que  $t_M$  es el tiempo de retención de la sustancia que no es retenida por la columna.

El compuesto que se utiliza como standard puede ser uno perteneciente a la muestra que se analiza, y del cual se conoce perfectamente su naturaleza. También puede adicionarse a la mezcla, previamente al análisis, un compuesto cuyo tiempo de retención lo sitúe en una zona intermedia y que además no solape a ninguno de los compuestos de la muestra.

### 3.6 Acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas (HRGC/MS) para el análisis de los compuestos volátiles de la oleoresina de pimentón

Una vez se ha optado por un método de extracción, el más adecuado para cada situación, se llega a una aplicación inevitable para la identificación de los compuestos volátiles que consiste en el acoplamiento cromatografía de gases de alta resolución/espectrometría de masas (HRGC/MS). Si bien comenzó a aplicarse en 1967, su verdadero desarrollo se observa desde el momento en que se puede conjugar la anterior combinación con las técnicas más sofisticadas, principalmente a nivel informático (Vernin, Lageot, 1992).

Si se somete una molécula a un bombardeo electrónico, se fragmenta más o menos, dependiendo de su estabilidad. Los fragmentos que se forman y sus intensidades relativas son característicos de la molécula. Si se almacena estos datos en un sistema informático, se puede generar una gran fuente de espectros de masas, que permiten dilucidar la naturaleza de aquellos compuestos separados mediante cromatografía de gases, por comparación con los espectros ya conocidos. El problema de comparación de los espectros es puramente informático, aunque la decisión final debe estar apoyada por razonamientos de técnicos especialistas.

### 3.7 Bibliografía

- [1] IRA KATZ. "Biogenesis of aromas. In Summation". *Biogenesis of Aromas. ACS Symposium Series*, 317 (1986), 381-386.
  - [2] E. LEMBERKOVICS AND G. PETRI. "Gas Chromatographic Characterization of Frequently Occurring Aromatic Compounds in Essential Oils". *J. Chromatogr.* (1988) 267-274.
  - [3] H. RICHARD, P. GIAMPOALI. "Extraits aromatiques et arômes". *Analisis Magazine* 20 (1992), M20-M22.
  - [4] P. SANDRA AND C. BICCHI. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis (Chromatographic Methods)*, Huetting, Heidelberg, 1987.
  - [5] G. TAKEOKA, S. EBELER AND W. JENNINGS. "Capillary Gas Chromatographic Analysis of Volatile Flavor Compounds". *Characterization and Measurement of Flavor Compounds. ACS Symposium Series*, 289 (1985), 95-108.
  - [6] G. VERNIN, C. LAGEOT. "Couplage CG/SM pour l'analyse des arômes et des huiles essentielles". *Analisis Magazine*, 20 (1992), M34-M39.
-

**SEGUNDA PARTE:  
PLANTEAMIENTO DE TRABAJO**



## CAPÍTULO 4

# EXTRACCIÓN (AISLAMIENTO) DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOCs)

---

### 4.1 La extracción de compuestos orgánicos volátiles de los productos naturales. Métodos de extracción (o aislamiento)

Si se consideran las características que presentan aquellos compuestos responsables del flavor de ciertas sustancias; sobresalen, fundamentalmente, las siguientes: la volatilidad, la solubilidad en una gran mayoría de disolventes orgánicos y su baja solubilidad en agua. Los métodos que conducen a conocer a los responsables del flavor se basan en alguna de las características mencionadas antes o en una combinación de más de una de ellas.

Hay que considerar ciertas premisas antes de intentar obtener los VOCs de una muestra:

- (a) La concentración de VOCs en una muestra acostumbra a ser muy pequeña, ello implica la obtención de una pequeña cantidad a partir de una cantidad de muestra mucho mayor.
- (b) Los VOCs son compuestos muy distintos entre sí, de masa molecular y naturaleza química muy diferentes, con unas concentraciones que varían dentro de intervalos muy amplios, aún en muestras de orígenes similares.
- (c) No existe una relación directa entre la influencia de cada componente del flavor y su concentración en la fracción volátil.
- (d) En la extracción de los VOCs se utilizan ciertas sustancias que favorecen a la misma y que luego es imprescindible eliminar o reducir; lo que obliga, en muchos casos, a realizar una etapa de concentración, como es en el caso del empleo de disolventes de alta pureza.

- (e) Hay que evitar la formación de sustancias contaminantes, causadas por cambios químicos o biológicos que se producen en la muestra durante el tratamiento de obtención de los VOCs, puesto que pueden producir interferencias.

Los equipos de que se dispone actualmente para el análisis y la identificación de los compuestos orgánicos volátiles de cualquier sustancia natural permiten un conocimiento adecuado de la muestra hasta el extremo de asumir que el perfil cromatográfico es una representación estricta de los VOCs presentes en la misma.

Debe tenerse en cuenta que los procesos o técnicas empleadas para la separación de los compuestos orgánicos volátiles puede influir profundamente en la composición final. Es por ello que se comentan brevemente las mencionadas técnicas, justificando su interés en la aplicación de la obtención de los VOCs de la oleoresina de pimentón.

Pueden enumerarse las siguientes técnicas de aislamiento y concentración para los compuestos orgánicos volátiles:

- Destilación
- Extracción
- Destilación y extracción simultáneas
- Espacio de cabeza estático
- Espacio de cabeza dinámico
- Extracción supercrítica

La anterior clasificación no puede contemplarse en términos absolutos, puesto que, de alguna forma, se ha realizado pensando en aquellas técnicas que, a priori, pueden ser positivas en su aplicación en la oleoresina de pimentón. Debe tenerse presente que se trata de un producto que ya proviene de una extracción con un disolvente orgánico, hexano o dicloroetano.

## 4.2 Destilación

Puede decirse que es el método más utilizado para obtener los VOCs a partir de materias no volátiles. No contiene sustancias que puedan interferir en el análisis cromatográfico, puesto que estas últimas no formarían parte del destilado. En el caso de la oleoresina de pimentón debe descartarse la destilación, puesto que la poca cantidad de compuestos volátiles no lo aconseja. Tampoco es aconsejable por las elevadas temperaturas que se pueden alcanzar, lo que podría perjudicar a los compuestos termolábiles.

Es más aconsejable la destilación por arrastre de vapor a presión atmosférica, que permite trabajar con temperaturas notablemente inferiores, y es así la forma como se obtienen la mayoría de aceites esenciales. Los VOCs se recogen en concentraciones muy pequeñas, lo

que obliga a realizar una extracción posterior. Existen otras desventajas como es la formación de sustancias que no estaban en el material de partida, que pueden formarse en reacciones de degradación térmica, lo que debe tenerse en cuenta al valorar los resultados.

La destilación a presión reducida mejora en algunos aspectos los resultados de la destilación a presión atmosférica, en la que se reducen notablemente aquellos compuestos extraños formados por degradación térmica, su mayor desventaja es la posible disminución de VOCs debido a posibles pérdidas por no condensación de alguno de los mismos. Es obligada la utilización de trampas frías a temperaturas muy bajas, situadas antes de la bomba de vacío, pero aún así es posible que se produzca alguna pérdida de VOCs con menores puntos de ebullición. Puede hablarse en términos parecidos de la destilación por arrastre de vapor a presión reducida.

Para el estudio de los VOCs de la oleorresina de pimentón no se ha considerado el uso de la destilación a causa de la poca cantidad de los mismos en el extracto. También se considera que se obtiene un mejor resultado aplicando la destilación y extracción simultáneas, como se indica en páginas posteriores.

### 4.3 Extracción

La extracción directa de una fracción volátil mediante un disolvente es una técnica muy simple, aunque presenta el problema de extraer otras sustancias, que son solubles en el disolvente empleado, y que pueden perjudicar los procesos de separación e identificación. Cuando el extracto se destina a un análisis cromatográfico e identificación posterior no se recomienda esta técnica, puesto que es muy probable la introducción de elementos de masa molecular elevada en el interior de la columna cromatográfica, con todos los problemas que ello comporta.

Si se considera la aplicación de una extracción directa a la oleorresina de pimentón, surgen problemas de todo tipo, puesto que debería trabajarse con un disolvente selectivo únicamente para los VOCs, lo que no es posible en las condiciones en que se presenta la muestra. Por todo ello es un método que debe descartarse desde el principio.

En este punto es conveniente indicar que la extracción clásica con Soxhlet, mediante un disolvente que se lleva a su punto de ebullición y se adiciona a la matriz a extraer, no tiene resultados positivos; puesto que se presenta el mismo problema que el que se ha indicado en el apartado anterior: no se dispone de un disolvente selectivo únicamente para los compuestos orgánicos volátiles.

En realidad, la ventaja que aporta este método, que es la adición de disolvente puro a la oleorresina no presenta mejora alguna, puesto que no realiza una extracción selectiva de VOCs. Este sistema de extracción puede emplearse para conseguir separar productos

orgánicos naturales (volátiles y no volátiles) con un rendimiento excelente.

#### **4.4 Destilación y extracción simultáneas (Método de Likens y Nickerson)**

Es un método que intenta aprovechar simultáneamente las ventajas de ambas técnicas, reuniendo la destilación por arrastre de vapor y la extracción en un mismo equipo. Las ventajas que presenta son:

- (a) Se pueden concentrar los VOCs hasta valores muy elevados a partir de una solución diluída en una sola operación y en un tiempo considerablemente corto.
- (b) Se utilizan cantidades muy pequeñas de disolvente con lo que se reduce el peligro de contaminación de la muestra causada por el propio disolvente.
- (c) Se puede reducir la degradación térmica empleando presión reducida.

Su empleo se ha generalizado, habiéndose aplicado para la obtención de VOCs de una gran cantidad de sustancias naturales.

Los resultados que se han obtenido en su aplicación a la oleorresina de pimentón, tanto a presión atmosférica como a presión reducida, hacen recomendable este método para la obtención de los correspondientes compuestos orgánicos volátiles, como se verá en el correspondiente capítulo.

#### **4.5 Espacio de cabeza (Headspace) estático**

Se trata de colocar una muestra de la sustancia de la que se desea determinar sus VOCs en un recipiente cerrado herméticamente en unas condiciones determinadas previamente, extrayendo una muestra del vapor que se encuentra por encima de la matriz y analizar los compuestos que contiene el mencionado vapor. Por todo ello no puede considerarse como un método de extracción en el sentido estricto de la palabra; sin embargo, se cita en este capítulo puesto que es otro método que ha permitido obtener muestras con un cierto contenido de VOCs. Se puede considerar que es el camino más sencillo de determinar la fracción volátil.

Las muestras a analizar pueden ser soluciones líquidas homogéneas, sólidos homogéneos o materiales no homogéneos. Si se trata de una muestra líquida, como es el caso de la oleorresina de pimentón, hay que definir la distribución constante de los analitos, teniendo en cuenta las variables de estado del sistema o el balance másico de los analitos entre la fase condensada y la fase gaseosa.

Las concentraciones respectivas en el vapor ( $C_v$ ) y en la muestra ( $C_s$ ) vienen determinadas (Hinshaw, 1990) por el coeficiente de distribución ( $K$ ), dependiente del componente y de la matriz que contiene la muestra, según la siguiente ecuación:

$$K = \frac{C_s}{C_v}$$

No cabe duda de que en el espacio de cabeza se encuentran presentes todas aquellas sustancias que, de alguna manera, son responsables del flavor de la muestra a tratar, en proporciones parecidas a las que llegan a los sentidos. Sin embargo, es muy complejo determinar la composición del espacio de cabeza debido a la baja concentración de la mayoría de sus componentes. Las concentraciones de VOCs en las dos fases no cambia con el transcurso del tiempo, una vez se ha alcanzado el equilibrio, aunque sí se puede hacer variar al tomar la muestra, lo que implica un estudio de la forma más adecuada de adquisición de la misma.

Los factores que influyen en la composición cuantitativa de los VOCs en el espacio de cabeza, según Nawar (1966) son los siguientes:

- La presión de vapor del componente en cuestión.
- El medio en que se encuentra el componente volátil y su solubilidad en el mismo.
- La concentración del volátil en la fase líquida.
- La miscibilidad del componente con otros disolventes orgánicos.
- Presencia de sales o azúcares en el medio en que se encuentra el volátil.

La presión de vapor es el factor más importante hasta el punto de que únicamente se obtengan cromatográficamente aquellos componentes cuya presión de vapor es más elevada. En muchos casos, como se dispone de una muestra con un elevado contenido en agua, el espacio de cabeza está formado mayoritariamente por vapor de agua, además de aire, reduciéndose aún más la concentración de los VOCs. En el caso de la oleoresina de pimentón no se presenta este problema, puesto que se trata de un extracto obtenido mediante un disolvente orgánico eliminado previamente, como ya se ha indicado antes.

Las ventajas de esta técnica son numerosas indicándose, a continuación, las más importantes, según Teranishi y Buttery (1962):

- No hay introducción de sustancias extrañas aportadas por disolventes, o impurezas de los mismos.

- Se reduce al máximo el problema de los cambios producidos por reacciones químicas o enzimáticas.
- Se elimina prácticamente la pérdida de compuestos que presentan una gran volatilidad.

También se deben considerar las limitaciones que introduce esta técnica:

- Hay compuestos que poseen una volatilidad media o baja y que, por esta razón, no aparecen en el cromatograma correspondiente, debido a que la sensibilidad del detector puede no ser suficiente para detectarlos, aunque su presencia influya en el flavor debido a que sí son detectados por los sentidos.
- Puede producirse una absorción de algunos compuestos orgánicos volátiles en la goma del tapón, lo que puede influir en estudios comparativos de matrices similares.
- Debido a la presencia de agua en la muestra que se introduce en el cromatógrafo y al gran volumen de la misma que se inyecta, aumenta el tiempo de inyección, lo que produce cromatogramas con mala resolución.
- El proceso de llenado de la jeringa y la inyección de la muestra puede presentar problemas debido a actuar contra presiones distintas a la existente en la propia jeringa.

Jennings y Filsoof (1977) confirman que en la técnica del espacio de cabeza estático se obtienen únicamente los picos correspondientes a compuestos mayoritarios que presentan una elevada presión de vapor y son capaces de activar el detector por las cantidades que presentan. Se puede pensar en una muestra con un mayor contenido en gases procedentes del espacio de cabeza, pero ello produce picos muy anchos y con poca resolución.

Todo lo expuesto antes hace suponer que esta técnica es muy recomendable para análisis rutinarios y rápidos, y con este concepto se ha aplicado al caso de la oleorresina de pimentón, cuyo comportamiento final produce unos aceptables cromatogramas, dependientes de la temperatura a la que se mantiene la muestra. Aunque no es el caso de la oleorresina de pimentón, por las razones ya indicadas (falta de VOCs de baja masa molecular), existen muestras con un elevado contenido en VOCs que ofrecen unos resultados excelentes con esta técnica analítica.

También debe considerarse el método de headspace estático con extracción múltiple, cuya única diferencia con la extracción simple consiste en inyectar una alícuota del espacio de cabeza procedente del mismo vial varias veces seguidas, esperando en cada ocasión que se vuelva a restablecer el equilibrio de la muestra antes de cada inyección. En principio este

método ofrece resultados más reproducibles que la extracción simple.

#### 4.6 Espacio de cabeza (Headspace) dinámico

En esencia consiste en la acción de un gas inerte, con flujo controlado, que arrastra los VOCs de una muestra, mantenida a una temperatura determinada, hasta una trampa que los retiene, seguida de una desorción de los mismos, para pasar a continuación a su análisis cromatográfico.

Según Núñez et al. (1984) hay que distinguir dos tipos de headspace dinámico:

- (a) **Headspace dinámico** propiamente dicho, consistente en obtener los VOCs de la superficie de la muestra, que está agitada a una temperatura constante, mediante el paso del gas inerte.
- (b) La técnica de **arrastre y atrape (purge and trap)** en la que el gas atraviesa la muestra, que se encuentra en agitación, y a una temperatura constante.

Existen diversos factores que afectan al proceso, tales como el diámetro y la longitud de las trampas, la forma y el tamaño del recipiente utilizado en el aislamiento, el tamaño de partícula y la superficie específica del adsorbente y la concentración original y la estructura química de los analitos en la muestra. Sin embargo, las tres variables fundamentales que controlan el proceso son:

- La temperatura a que se somete la muestra.
- El tiempo de extracción, hasta que se considera finalizada la operación.
- El flujo de arrastre que se aplica a la muestra.

Las dos últimas variables se fijan de antemano, teniendo en cuenta que valores demasiado pequeños pueden generar un arrastre defectuoso, mientras que los valores demasiado elevados pueden producir pérdidas de VOCs.

La temperatura está condicionada por el tipo de compuestos que se desea analizar, ya que si se trabaja a temperaturas consideradas bajas, 60-70°C, los VOCs obtenidos corresponden a los realmente presentes en la muestra en el momento del análisis, obteniéndose cantidades muy pequeñas, con lo que el análisis es muy delicado.

Si se emplean temperaturas más elevadas, aproximadamente hasta 160°C, los compuestos no corresponden solamente a los realmente presentes, sino que también pueden aparecer compuestos volátiles procedentes de degradación térmica de algunos precursores. En este

caso las cantidades recuperadas son mayores y el análisis se puede llevar a cabo con mayor facilidad.

Se hace incidencia en el segundo tipo, purge and trap, debido a que se considera esta técnica más importante para el tratamiento de los VOCs de la oleorresina de pimentón, por ser éstos de presiones de vapor más bajas y masas moleculares más altas de lo normal, a causa del tratamiento que han sufrido en la preparación de la oleorresina. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la aplicación de ambas técnicas en la oleorresina de pimentón, permiten la utilización de ambos métodos.

En la técnica de purge and trap, una vez se arrastran los VOCs, es necesario realizar una concentración, para conseguirlo se pueden seguir dos caminos: (a) empleando trampas adsorbentes y (b) empleando trampas criogénicas.

Las trampas adsorbentes están formadas por un tubo de vidrio relleno de material adsorbente, de esta manera, al pasar el gas inerte a través de la trampa adsorbente, se retienen los VOCs. Se han utilizado muchos materiales para conseguir atrapar a los compuestos volátiles en las trampas, desde carbón activado hasta materiales poliméricos que presentan gran porosidad (Tenax, Porapak, Chromosorb, etc.).

Para recuperar los VOCs hay que efectuar una desorción que puede ser mediante disolventes o térmica. En cualquier caso, ambas presentan problemas para la recuperación de los VOCs, puesto que en unos casos la desorción térmica puede ser perjudicial para ciertos compuestos, y en otros casos la recuperación con disolventes puede no ser completa.

Las trampas criogénicas están formadas por una columna o un capilar que se mantienen a temperatura muy baja, con el fin de condensar los VOCs y dejar pasar el gas inerte. Esta técnica no se considera oportuna para la oleorresina de pimentón, debido a la baja concentración en VOCs.

#### **4.7 Extracción supercrítica**

Se trata de una técnica reciente que está experimentando nuevas aplicaciones en la extracción de los VOCs de ciertas plantas. Ello se debe a las propiedades que presenta el dióxido de carbono en el dominio supercrítico ( $P_c > 73,8$  bar y  $T_c > 31,3^\circ\text{C}$ ):

- Viscosidad comparable a la de un gas.
- Coeficiente de difusión intermedio entre el de gas y el de líquido.
- Masa volumétrica función de la presión, por lo que está más próxima a la de un líquido si la presión es elevada.

- Polaridad cercana a la del pentano; pero, al aumentar la presión, se puede comparar a la del cloruro de metileno.

El principio de la extracción es muy sencillo: el gas puede comprimirse hasta una densidad próxima a la de un líquido en condiciones supercríticas, el fluido que se obtiene posee las propiedades físicas de su estado gaseoso y las propiedades químicas de su estado líquido. El poder disolvente de un fluido supercrítico se puede aumentar si se aumenta su relación masa/volumen. Se comprime y calienta a una presión y temperatura que se escogen en función del tipo de extracción que se desea llevar a cabo. Atraviesa después el recipiente que contiene la sustancia que se desea extraer. Si se le lleva a una presión inferior a la crítica pierde sus propiedades como disolvente, lo que permite que se pueda recuperar el soluto.

Para la extracción de sustancias volátiles no son necesarias grandes presiones, se ha comprobado que 60 bar y 40°C son condiciones suficientes para la obtención de un producto comparable a un aceite esencial, si se llega a 300 bar se obtiene un producto comparable a una oleorresina.

Se puede mejorar la polaridad del dióxido de carbono si se le añade un disolvente polar (etanol o agua) que mejore el rendimiento de la extracción de compuestos polares, sin tener que aumentar la presión de forma excesiva.

#### 4.8 Bibliografía

- [1] A. COLE AND E. WOOLFENDEN. "Sample Preparation Perspectives: Gas Extraction Techniques for Sample Preparation in Gas Chromatography". *LC-GC Intl.* 5, No.3 (1992), 8-15.
- [2] J. ALBEROLA Y L. IZQUIERDO. "La fracción aromática del zumo de naranja. II. Análisis del espacio de cabeza". *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 19 (1979), 327-337.
- [3] L.S. ETTRE, J.E. PURCELL, J. WIDOMSKI, B. KOLB AND P. POSPISIL. "Investigations on Equilibrium Headspace-Open Tubular Column Gas Chromatography". *J. Chromatographic Science* 18 (1980), 116-125.
- [4] J.L. GUINAMANT. "Extraction des composés volatils et/ou semi-volatils". *Analisis Magazine* 20, nº1 (1992), M43-M45.
- [5] J.L. GUINAMANT. "L'extraction en phase supercritique (SFE)". *Analisis Magazine*, 20 (1992), M36-M38.
- [6] JOHN V. HINSHAW. "Headspace Sampling". *LC-GC Intl.* 3, No.6 (1990), 20-23.
- [7] W.G. JENNINGS AND M. FILSOOF. "Comparison of sample preparation techniques for gas chromatography analysis". *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977), 440-445.
- [8] VAL J. KRUKONIS. "Supercritical Fluid Extraction in Flavor Applications". *Characterization and*

- Measurement of Flavor Compounds*". ACS Symposium Series, 289 (1985), 155-175.
- [9] R.E. MAJORS. "Sample Preparation Perspectives: Supercritical Fluid Extraction - an Introduction". LC-GC Intl. 4, No.3 (1991), 10-17.
- [10] A. MATEOS Y E. CARBONELL. "Análisis de la fracción aromática de alimentos. Técnicas de extracción y concentración". Rev. Agroquím. Tecnol. Alim. 30 (1990), 431-444.
- [11] M.T. MORALES, R. APARICIO Y F. GUTIÉRREZ. "Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles en aceites vegetales". Grasas y Aceites 43 (1992), 164-172.
- [12] R. NÄF. "La préparation d'extraits, une étape cruciale dans l'analyse des arômes". Analisis Magazine, 20 (1992), M23-M25.
- [13] W.W. NAWAR. "Some considerations in interpretation of direct headspace gas chromatographic analyses of food volatiles". Food Technol. 20 (1966), 213-215.
- [14] A.J. NÚÑEZ, L.F. GONZÁLEZ AND J. JANÁK. "Pre-concentration of Headspace for Trace Organic Analysis by Gas Chromatography". J. Chromatographic Science 300 (1984), 127-162.
- [15] C.L. PAUL THOMAS. "Sample Preparation Perspectives: Sampling for Volatile Species". LC-GC Intl. 6 (1993), 8-12.
- [16] WILLIAM PIPKIN. "Sample Preparation Perspectives: Fundamental Considerations for SFE Method Development". LC-GC Intl. 5, No.1 (1992), 8-10.
- [17] H. RICHARD, A. LOO, P. GIAMPAOLI. "L'extraction des plantes aromatiques par le dioxyde de carbone". Analisis Magazine, 20, n°1 (1992), M39-M42.
- [18] P. SANDRA AND C. BICCHI, *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis (Chromatographic Methods)*, Hueting, Heidelberg, 1987.
- [19] P. SCHREIER, *Chromatographic Studies of Biogenesis of Plant Volatiles (Chromatographic Methods)*, Hüthing, Heidelberg, 1984.
- [20] R. TERANISHI AND R.G. BUTTERY. "Aromagrams. Direct vapor analyses with gas chromatography". Intern. Fed. Fruit Producers, Symposium Volatile Fruit Flavours. (1962), pág. 257.
-

## **CAPÍTULO 5**

# **SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES**

---

### **5.1 Separación de los compuestos orgánicos volátiles obtenidos mediante técnicas de extracción**

Cualquiera que sea la técnica de extracción (aislamiento) que se haya utilizado para separar los VOCs de su matriz natural, la oleorresina; hay que buscar una técnica que permita separarlos en primer lugar, para pasar a su identificación posterior.

Ya se ha indicado que la técnica que produce unos resultados más positivos en su separación es la cromatografía de gases de alta resolución. El empleo de columnas capilares es básico para llegar a unos buenos resultados. Si bien su empleo fué dificultoso al principio, debido a su elevado precio, actualmente son las únicas que se utilizan con regularidad.

Como columnas capilares se han utilizado diversos tipos (WCOT, SCOT, PLOT, WWCOT); de cualquier forma, el tipo más usual es WCOT (wall coated open tubular), en el que la fase estacionaria está depositada directamente sobre el interior de la pared de la columna.

Para el control de las técnicas de extracción, su duración, resultados, efectividad, etc., se utiliza un cromatógrafo de gases FISIONS SERIE 8000, con las siguientes características generales:

- Columna capilar DB-1 (J & W) (no polar), de 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Inyector split.
- Detector de ionización de llama (FID), con nitrógeno como make up.

- Gas portador: helio.

En cada caso particular se indicarán las condiciones de realización del análisis cromatográfico concreto, tanto las que se han detallado anteriormente, como aquellas que se crea que pueden influir en los resultados de un análisis determinado.

Hay que resaltar que la concentración de VOCs en una muestra resultado de una extracción puede suponer cambios importantes en las condiciones del análisis. La relación de split debe ser estudiada para cada caso con el fin de no introducir un exceso de muestra en la columna, pero sin perder sensibilidad por ello. La capacidad de muestra se determina, fundamentalmente, a través de la cantidad total de fase estacionaria que hay en el interior de la columna.

Según Sandra y Bicchi (1987), la elección de la fase estacionaria es menos crucial, aunque puede influir en la resolución final de alguno de los picos. Las columnas capilares también permiten llevar a cabo una separación cromatográfica a temperaturas inferiores a las necesarias en columnas empaquetadas, con todas las ventajas que ello supone para los compuestos termolábiles. Su principal desventaja es la baja capacidad de muestra, tema que ya se ha comentado previamente.

Takeoka et al. (1985) realizan un estudio del análisis cromatográfico de diversos aromas obtenidos mediante los mismos procedimientos que los que se han utilizado en este trabajo. También compara los resultados obtenidos según diversas técnicas de extracción de la muestra.

De los distintos trabajos que existen en la bibliografía se pueden obtener ciertas condiciones que se mantienen constantes en la mayoría de ellos, en relación a la programación de la temperatura. En primer lugar, se comienza el análisis a una temperatura muy baja, para pasar posteriormente a una rampa de temperaturas (de 2 a 4°C por minuto), hasta llegar a un valor final de la misma, donde se estabiliza hasta el final del cromatograma. En ocasiones es conveniente realizar más de una isoterma, o también, comenzar el cromatograma con una isoterma de pocos minutos para que se eluya el disolvente en el caso de que se utilice como portador de la muestra. Todo ello viene determinado por la propia naturaleza de la muestra que se inyecta y para mejorar la resolución de ciertos picos. En los análisis realizados en este trabajo se ha procurado optimizar al máximo estas condiciones, procurando que sean constantes en los distintos cromatogramas y así poder realizar comparaciones entre ellos.

En referencia al detector utilizado existe una aceptación mayoritaria en el empleo del detector de ionización de llama (FID), que presenta una respuesta excelente en el caso de compuestos orgánicos, aunque interfiere en alguno de ellos cuando la muestra se encuentra en un disolvente, lo que puede enmascarar alguno de los picos que salen en los primeros lugares, aunque este problema ya se ha tenido en cuenta.

En el caso de la oleoresina de pimentón, la elución del disolvente no presenta excesivos

problemas de enmascaramiento de VOCs; puesto que ya se ha indicado que la técnica de obtención de la misma no permite la existencia de compuestos orgánicos volátiles de punto de ebullición muy bajo, excepto que se formen debido a las temperaturas alcanzadas en el proceso de extracción.

La velocidad del gas portador no debe considerarse un parámetro definitivo si no se trata de economizar tiempo, puesto que una variación de la misma no comporta excesivas mejoras en la separación cromatográfica si no se consideran valores muy extremos, tal y como puede desprenderse de la gráfica de van Deemter, donde se observa que para disminuir la altura equivalente de un plato teórico de forma considerable, hay que disminuir la velocidad del gas portador de forma muy radical.

Hay que indicar que no se emplea únicamente la cromatografía de gases para la separación de compuestos volátiles, también se ha utilizado con gran éxito la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en particular cuando se pueden producir descomposiciones térmicas de los VOCs. Esta técnica se aplica, en mayor grado, a los aceites esenciales.

## **5.2 Identificación de los compuestos orgánicos volátiles mediante espectrometría de masas**

Una vez se haya conseguido separar los VOCs de la oleorresina de pimentón mediante el uso de un programa cromatográfico adecuado, hay que proceder a su identificación mediante el acoplamiento cromatografía de gases/espectrometría de masas. Esta técnica ha permitido, en los últimos años, la identificación de gran cantidad de sustancias volátiles, y actualmente su número está aumentando de manera progresiva gracias a su aplicación.

La espectrometría de masas es un método de separación y medición de masas con finalidades analíticas generales. Se fundamenta en que el comportamiento de los iones en relación a su masa es fácilmente influible por campos magnéticos y eléctricos, de tal manera que se puede conseguir una separación de masas suficientemente rápida y precisa.

Por lo indicado antes, las funciones de un espectrómetro de masas serán las siguientes:

- Producción de iones
- Separación de los iones según su masa
- Medición de la masa y abundancia de los iones

Todo ello conduce a dividir un espectrómetro de masas en tres partes fundamentales:

- La fuente de iones
- El analizador de masas, donde se produce la separación
- El colector, donde se recogen y se miden con precisión

La ionización por impacto electrónico se produce cuando se fuerza la ionización de las moléculas de la muestra a causa de una corriente de electrones a 70 eV, habiéndose establecido el vacío. La emisión de electrones es producida por un filamento incandescente de wolframio o renio, concentrándose en un haz, después de ser acelerados magnéticamente en sentido transversal a la dirección de la corriente de vapor de la muestra. La molécula se fragmenta en una serie de iones, que son expulsados de esta cámara de ionización y focalizados hacia el analizador de masas, mediante una lente electrónica.

El poder de resolución del espectrómetro de masas viene determinado por la manera como pueden concentrarse los iones, y poder distinguir unos de otros. También se puede definir como la diferencia mínima de masa que un ión de masa  $m$  debe tener en relación a otro para poder obtenerlos como señales separadas.

El espectro de masas exige el registro de todos los iones formados y separados de manera que permita la medición precisa de su masa y abundancia. Actualmente, los equipos más modernos se construyen de manera que cada intervalo de masas que interesa se pueda registrar en pocos segundos; lo que permite acoplar un cromatógrafo de gases y obtener el espectro de masas completo, según la velocidad de elución de las diferentes fracciones separadas de la columna cromatográfica.

El acoplamiento HRGC/MS es el método más potente que se encuentra disponible para la identificación y/o determinación de trazas de compuestos orgánicos que se encuentran en matrices complejas. Si se compara con los antiguos métodos basados, por ejemplo, en comparaciones cromatográficas fundamentadas en el empleo de diversas columnas, e incluso de detectores selectivos, los resultados son espectaculares.

Cuando estos potentes instrumentos analíticos se acoplan a un ordenador, se consigue un método de reconocimiento rápido y relativamente fiable, aunque no hay que dar por definitivo resultado alguno que sea proporcionado mediante este sistema informático, sino que debe verificarse cada espectro de manera personalizada. Los métodos comparativos se basan en buscar los espectros de masas de referencia en una librería, en la lista de compuestos cuyo espectro de masas es similar al espectro de la sustancia desconocida.

El empleo de estos métodos implica dos pasos esenciales: por un lado el establecimiento de una librería, y por otro, disponer de un sistema de comparación de espectros. Generalmente, el sistema informático compara el espectro del compuesto desconocido con los que contiene en su librería y propone un cierto número de espectros como los más parecidos al problema. De esta manera, la decisión definitiva la debe tomar el analista, que debe discernir de entre los espectros propuestos, aquel que corresponde al compuesto desconocido.

Para realizar la búsqueda en librería es necesario un algoritmo adecuado que compare la

nsimilitud de los espectros y una base de datos, el éxito final depende de la calidad y diversidad de la librería. Dichos algoritmos se clasifican en dos tipos: "matching" e "interpretative". El sistema "matching" es el primero que se intenta, si los resultados no son suficientemente buenos, se utiliza el sistema "interpretative". El primero compara el espectro desconocido con los espectros de referencia, el segundo intenta extraer información estructural de un espectro problema, basándose en reglas y correlaciones espectrales.

### 5.3 Bibliografía

- [1] F.W. KARASEK, R.E. CLEMENT. *Basic Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Principles and Techniques*. Elsevier, Amsterdam, 1988.
  - [2] ROBERT L.GROB. *Modern Practice of Gas Chromatography*. Second Edition. John Wiley & Sons, New York, 1985.
  - [3] J.L. LE QUÉRÉ. "Le couplage CGP/IRTF dans l'analyse des arômes". *Analisis Magazine*, **20**, (1992), M46-M49.
  - [4] P. SANDRA AND C. BICCHI. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis (Chromatographic Methods)*, Hueting, Heidelberg, 1987.
  - [5] G. TAKEOKA, S. EBELER AND W. JENNINGS. "Capillary Gas Chromatographic Analysis of Volatile Flavor Compounds". *Characterization and Measurement of Flavor Compounds. ACS Symposium Series*, **289** (1985), 95-108.
  - [6] G. VERNIN, C. LAGEOT. "Couplage CG/SM pour l'analyse des arômes et des huiles essentielles". *Analisis Magazine*, **20**, (1992), M34-M39.
-



**TERCERA PARTE:  
EXPERIMENTAL**



## CAPÍTULO 6

# APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE DESTILACIÓN Y EXTRACCIÓN SIMULTÁNEAS A LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN

---

### 6.1 El método de Likens y Nickerson aplicado a la extracción de los compuestos orgánicos volátiles de la oleorresina de pimentón (método a presión atmosférica)

De los sistemas de extracción de VOCs que se han citado anteriormente, se considera el método de destilación-extracción de Likens y Nickerson como el que puede aportar mayores posibilidades de éxito en su aplicación a la oleorresina de pimentón. También se ha tenido en cuenta su reproducibilidad, que, sin considerarse compleja, no deja de ser laboriosa.

Las razones que han conducido a esta consideración se indican a continuación:

- El tratamiento de producción de la oleorresina de pimentón presupone la existencia de VOCs con masa molecular superior a la de los existentes en la planta primitiva, como se verá más adelante.
- Las propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de pimentón presuponen un comportamiento en medio acuoso que facilita el arrastre de vapor.
- La composición química mayoritaria de la oleorresina de pimentón, determinada de forma muy aproximada, predice la posible formación de compuestos de masa molecular muy inferior a la de los compuestos iniciales, por biogénesis o descomposición de éstos.

El funcionamiento del equipo de Likens y Nickerson, que se muestra en la figura 6.1, que sigue a continuación, es sencillo y de fácil manipulación. Sigue un comentario sobre sus

rasgos principales.

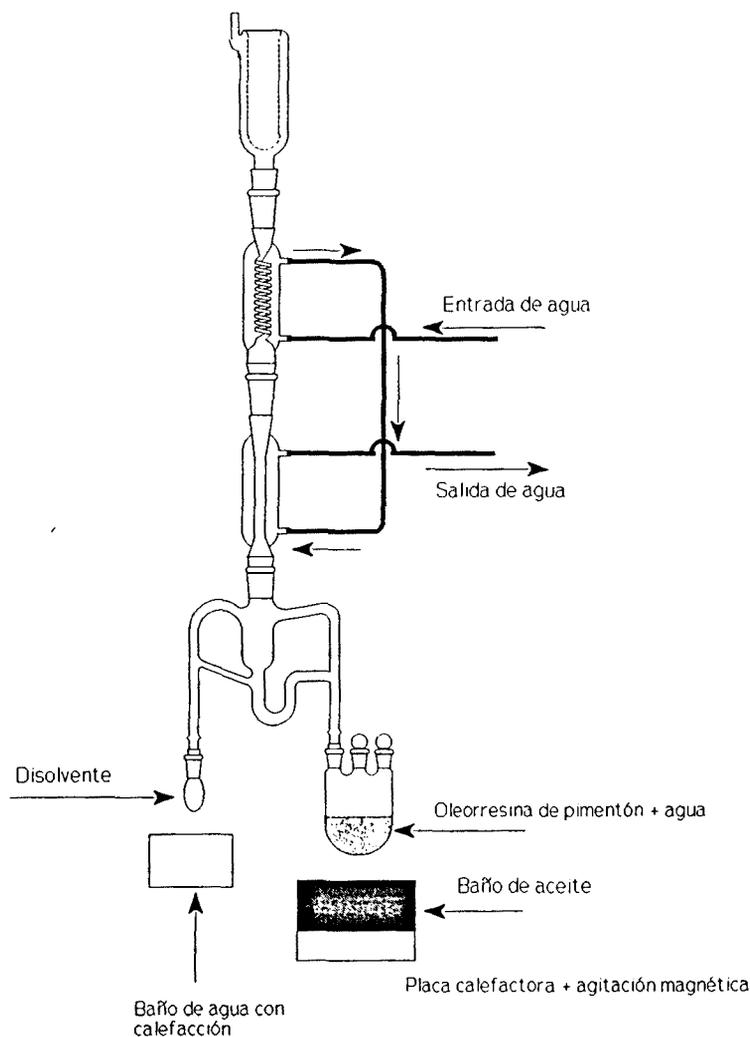


Figura 6.1 Sistema de extracción de Likens-Nickerson.

Según la disposición del esquema, la densidad del disolvente debe ser inferior a la del agua. El disolvente debe ser, además, inmisible en agua. En el balón de la derecha se coloca la oleorresina de la que se desea extraer los VOCs que contiene, y en el de la izquierda el disolvente o disolventes empleados para la extracción. El balón que contiene el disolvente tiene un volumen pequeño para conseguir una mayor concentración de VOCs, lo que facilita su detección cuando se inyecta en el equipo de cromatografía de gases.

Una manta de calefacción eléctrica hace que se produzca el arrastre mediante vapor de agua. Para la ebullición del disolvente es suficiente el empleo de un baño calefactor de polietilenglicol, con el aporte de energía mediante una placa calefactora eléctrica. Los vapores, al alcanzar el refrigerante condensan, por lo que se dirigen a la zona central del extractor,

donde se encuentran las dos fases: la superior, formada por el disolvente y los productos VOCs extraídos, y la fase inferior formada por el agua que se ha añadido a la oleorresina.

A medida que avanza la extracción, cada fase vuelve al balón de que procede, convirtiéndose en un proceso de extracción continuo. Según la temperatura del agua de refrigeración es recomendable el empleo de una última trampa con una disolución de acetona y hielo, que permite alcanzar muy bajas temperaturas y así evitar la pérdida de disolvente e incluso de los compuestos más volátiles extraídos.

## 6.2 Equipo de extracción a presión atmosférica empleado experimentalmente

Basándose en el sistema expuesto en el apartado anterior, se ha llevado a cabo con éxito la extracción de los volátiles de la oleorresina de pimentón mediante el empleo de un sistema de extracción basado en el aparato de Likens y Nickerson.

El cuerpo central del extractor se muestra en la figura 6.2, dicho cuerpo ha sido construido por la empresa Vidra Foc, S.A. de Barcelona, y en la mencionada figura se muestran las medidas del mismo. El diseño debe ser muy exacto para conseguir que tanto el agua como el disolvente vuelvan a los balones de donde proceden, ello se consigue mediante las distintas alturas de los tubos de retorno a los mencionados balones.

En el esquema se pueden ver las medidas de cada uno de los componentes del cuerpo de extracción. Obsérvese que el dedo frío permite asegurar una buena condensación de los vapores. Se ha notado mucho la temperatura del agua de refrigeración según la época del año, por lo que se ha considerado adecuado acoplar un refrigerante Dimroth de 30 cm de longitud útil, y así asegurar la condensación. También según la temperatura ambiente es aconsejable aislar el tubo que conduce al disolvente hasta el centro del cuerpo de extracción, de esta forma se evita un recalentamiento del disolvente y de los VOCs extraídos, contenidos en el mismo.

Si bien en su momento se presenta la descripción del equipo de Likens y Nickerson, y su funcionamiento para la extracción a presión reducida, puede avanzarse en este apartado que, esencialmente, consta del mismo diseño, además de ir provisto de un refrigerante en la parte superior, donde se introduce una mezcla de anhídrido carbónico y acetona, lo que permite alcanzar temperaturas de  $-80^{\circ}\text{C}$ , suficientes para garantizar la condensación de cualquier compuesto orgánico volátil y la del propio disolvente.

Este método de producción de bajas temperaturas es muy seguro si se tiene en cuenta que, a medida que transcurre el tiempo, la mezcla frigorífica pierde efectividad de forma lenta al principio, para pasar a calentarse con una velocidad considerable, por lo que es imprescindible tener en cuenta un control exhaustivo de la temperatura, con la correspondiente adición de anhídrido carbónico, para evitar problemas irreversibles.

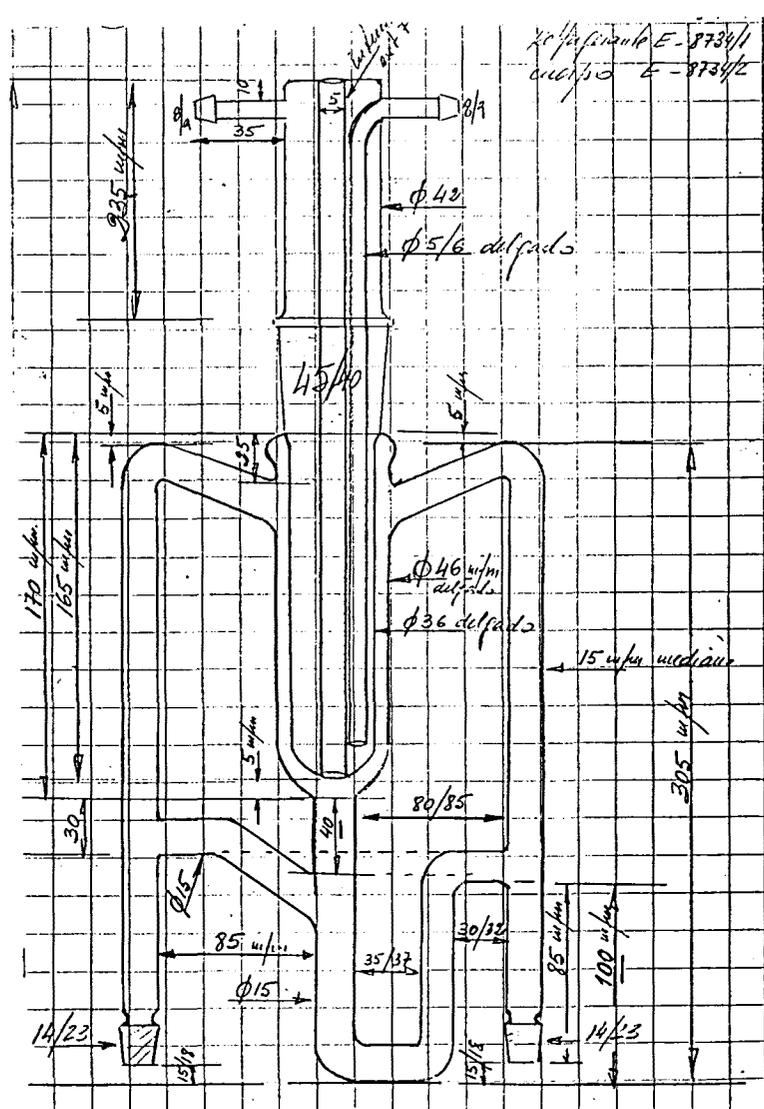


Figura 6.2 Cuerpo del sistema de extracción.

### 6.3 Disolvente utilizado para la extracción

Se ha indicado que, por razones obvias, el disolvente debe ser inmisible en agua, esto hace que deban descartarse diversos disolventes que, a priori, pueden parecer adecuados. Además, por la propia construcción del equipo de extracción, el disolvente debe ser de densidad inferior a la del agua, de esta manera vuelven al balón de donde proceden, tanto el agua como el disolvente.

El punto de ebullición del disolvente ha de ser lo más bajo posible, con ello se consigue que la temperatura del balón donde se encuentra el mismo sea lo suficientemente baja como para evitar problemas con los VOCs ya extraídos; los cuales, como se verá más adelante, son susceptibles de cambios a temperaturas elevadas.

Se han probado varios disolventes, basándose en los citados en la bibliografía existente sobre esta técnica de extracción. Finalmente, el más aconsejable es el hexano, (p.e. = 69°C), ya que la utilización de pentano (p.e. = 36,1°C) comporta problemas por su bajo punto de ebullición y el isooctano (p.e. = 117,2°C) presenta problemas por su elevado punto de ebullición, ya que produce un recalentamiento en los productos extraídos al evaporar el disolvente. Se han descartado otros disolventes, con posibilidades a priori, por ser solubles en agua. Teniendo en cuenta que la obtención de la oleorresina de pimentón se realiza con hexano, en principio los VOCs deben presentar una solubilidad afín con el mismo. La insolubilidad del hexano con el agua no ofrece problemas bajo este punto de vista.

#### 6.4 Problemas durante el proceso de extracción

Para evitar la formación de espuma se introduce un sistema de agitación en el balón que contiene la oleorresina. En primer lugar se ha utilizado un matraz de 250 ml, con agitación magnética. Este sistema funciona bien cuando se trata de muestras de oleorresina, aunque presenta una ligera tendencia a la producción de espuma. Si la muestra es cáscara de pimiento o bola fresca, la formación de espuma es considerable, lo que no permite que se lleve a cabo la extracción correctamente.

Se han probado sustancias antiespumantes, con base de siliconas, sin embargo éstas se han convertido en moléculas de masa molecular inferior y han sido arrastradas por el agua apareciendo en cromatogramas posteriores, lo que no hace aconsejable su uso para evitar la formación de espuma.

La mejor solución a la formación de espuma ha sido la introducción de agitación mecánica, mediante un agitador de ánora. Esta solución ha obligado a trabajar con un balón de mayor volumen, empleándose un reactor de 1 litro de capacidad. Con este sistema la formación de espuma ha desaparecido. También se ha conseguido una mayor concentración de VOCs (facilitando la detección cromatográfica) puesto que no se ha variado el volumen del balón que contiene al disolvente, ni la sensibilidad del detector del cromatógrafo.

#### 6.5 Variables que influyen en la extracción (agitación magnética)

Una vez se elige el disolvente, se tiene en cuenta otros factores que pueden influir en la extracción de los VOCs de la oleorresina de pimentón. El más inmediato es el tiempo que debe durar la extracción, se supone que debe utilizarse el menor posible, puesto que los volátiles pueden sufrir transformaciones en el caso de que se sometan a temperaturas elevadas durante mucho tiempo.

La determinación de la duración de la extracción se ha realizado mediante el seguimiento de la misma a través de análisis utilizando cromatografía de gases. Durante intervalos constantes

de tiempo se han realizado cromatogramas en las mismas condiciones analíticas que las utilizadas definitivamente para la separación de los VOCs extraídos.

En los cromatogramas correspondientes se observa que, a medida que transcurre el tiempo de extracción, las alturas relativas de los picos correspondientes a los compuestos que salen hacia el final del cromatograma crecen, manteniéndose más parecidas las alturas relativas correspondientes a los picos que aparecen en los primeros lugares de los cromatogramas. Cuando no se aprecia una variación de alturas relativas se considera que la extracción puede darse por finalizada.

Para obtener todos los VOCs extraídos es conveniente seguir destilando disolvente para recuperar aquellos que se encuentran en el disolvente situado en el cuerpo del sistema de extracción. De esta forma se enriquece la muestra a inyectar y se favorece una aproximación cuantitativa de los VOCs presentes.

Los cromatogramas de las figuras 6.3, 6.4, y 6.5 muestran la evolución de la extracción con el tiempo. Se ha elegido la última zona del cromatograma para su estudio, la razón es que los VOCs de menor masa molecular son arrastrados antes. Los picos correspondientes a la zona final del cromatograma corresponden a diversos ácidos, como se verá más adelante, y pueden indicar el final de la extracción.

Para el análisis cromatográfico se han inyectado 3  $\mu$ l de disolvente con los VOCs extraídos hasta el momento indicado en cada cromatograma. Se puede observar una evolución de la extracción que es directamente proporcional al tiempo de duración de la misma. Hay que indicar que los datos utilizados hasta aquí se han obtenido mediante un arrastre de vapor con agitación magnética, sin utilizar la agitación mecánica.

La figura 6.3 muestra que durante las tres primeras horas de extracción los VOCs que ocupan los últimos lugares prácticamente no han sido arrastrados.

Cuando han transcurrido siete horas de extracción, el cromatograma presenta unos picos cuyas alturas relativas son mayores, como se observa en la figura 6.4. La extracción no ha finalizado a las siete horas de operación, como lo demuestra la figura 6.5 en la que puede observarse un aumento en las alturas relativas de los picos.

En los cromatogramas correspondientes a sucesivas extracciones, ya no se produce ningún aumento de alturas relativas, lo que indica que la extracción puede darse por finalizada. El control del tiempo de extracción es un parámetro muy importante para evitar una exposición muy larga a temperatura elevada de la oleoresina de pimentón, situación que puede tener consecuencias negativas sobre los compuestos, volátiles y no volátiles, como se discutirá en capítulos posteriores, aunque el propio proceso de extracción de la oleoresina presente operaciones individuales en las que sería conveniente minimizar el tiempo de duración de las mismas.

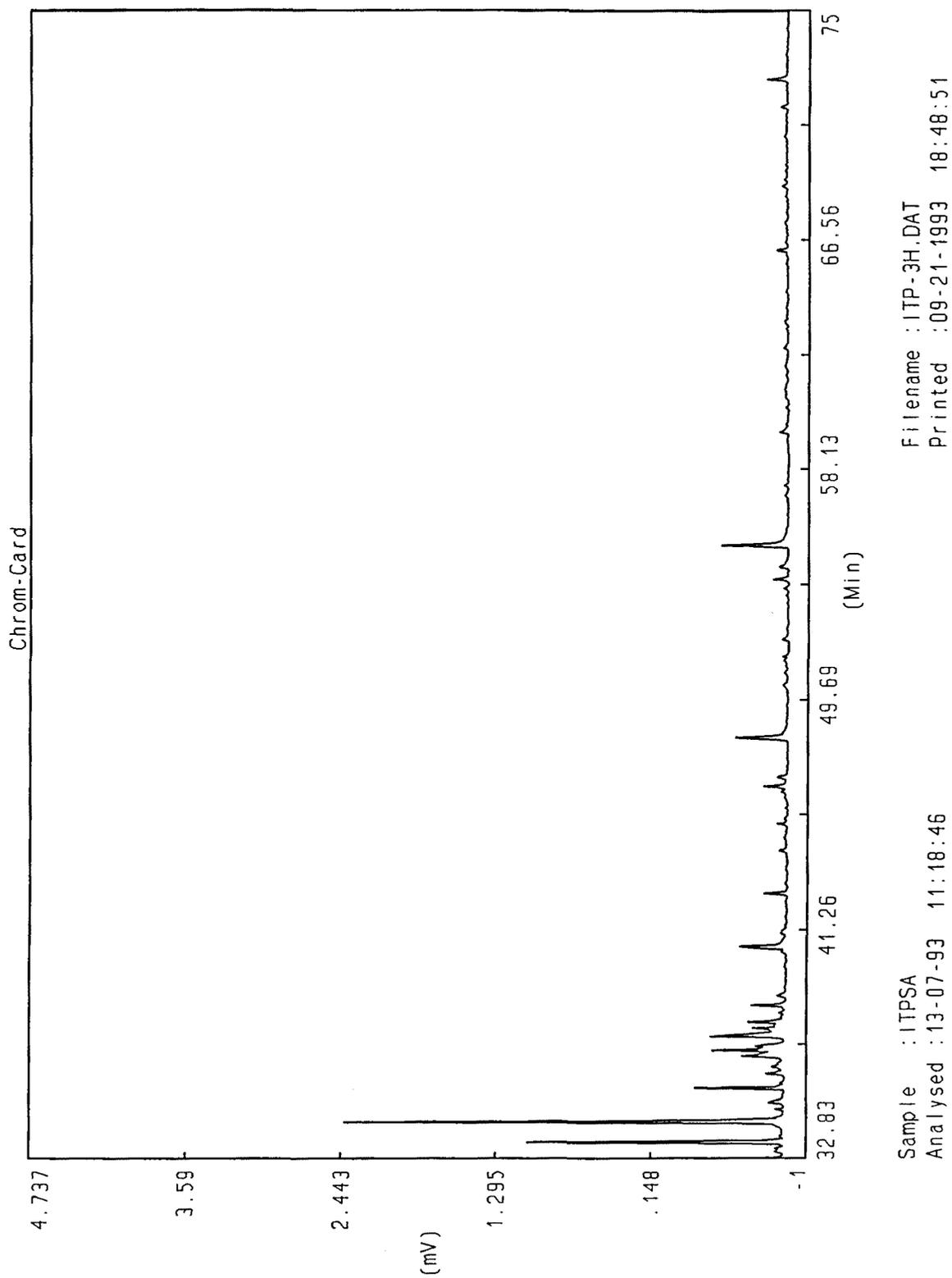


Figura 6.3 Cromatograma después de 3 horas de extracción.

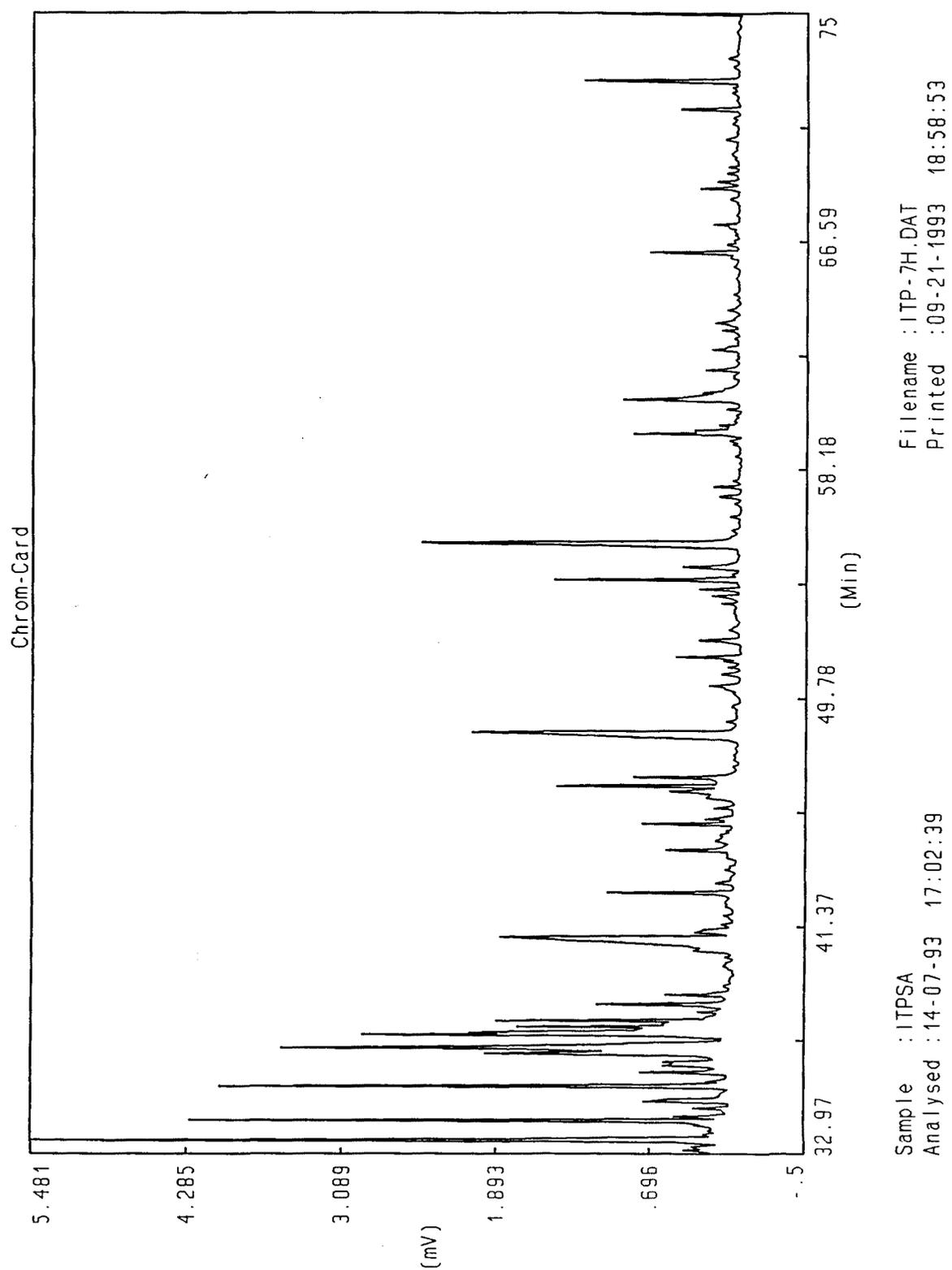
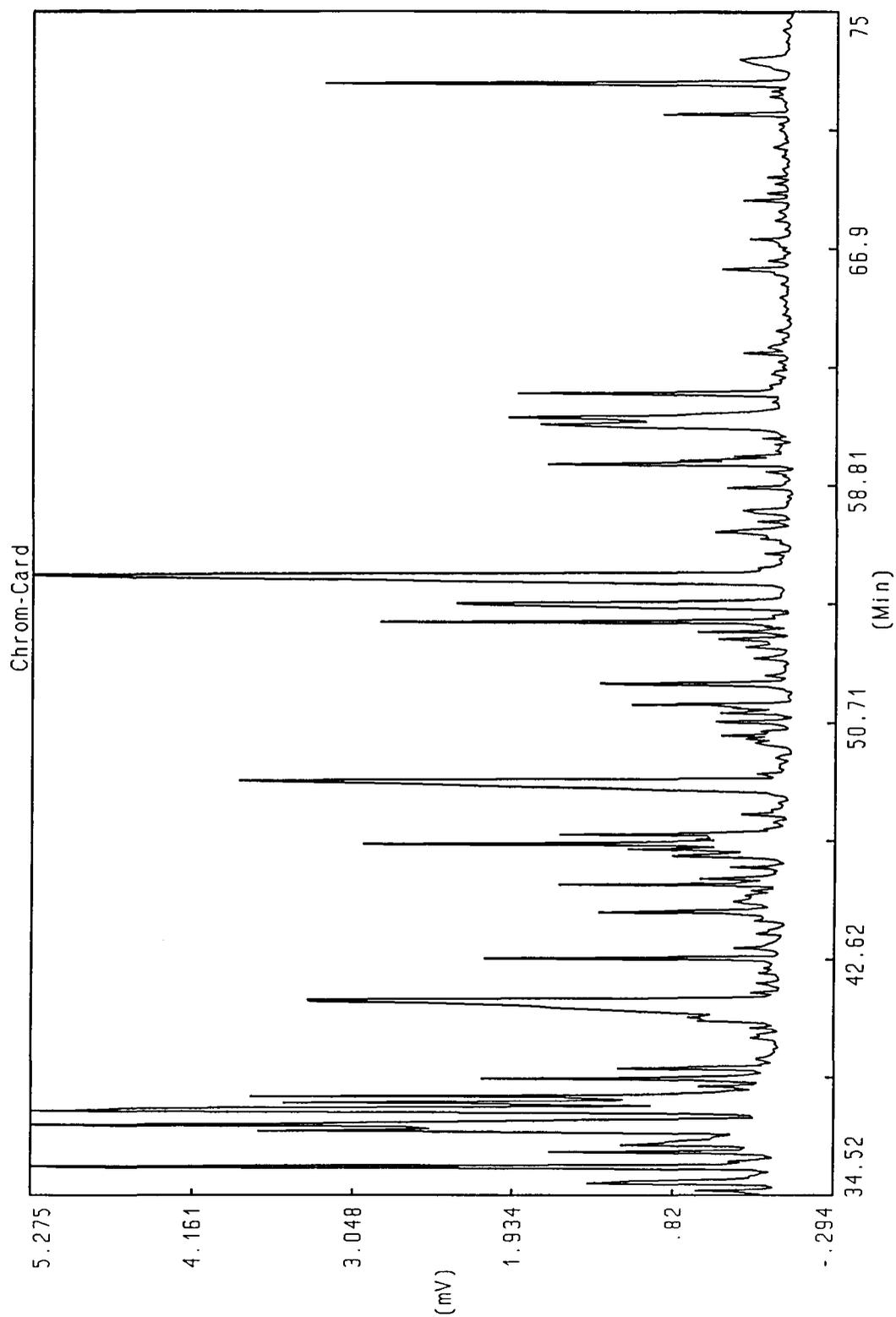


Figura 6.4 Cromatograma después de 7 horas de extracción.



Sample : ITPSA  
Analysed : 19-07-93 17:14:42

Filename : ITP-9H.DAT  
Printed : 09-21-1993 19:05:59

Figura 6.5 Cromatograma después de 9 horas de extracción.

Las condiciones cromatográficas completas se indican a continuación:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Programa de temperaturas: 40° hasta 250° (3°/min), isoterma a 250° (5 minutos).
- Inyección: 3  $\mu\text{l}$ .
- Split 10:1.
- Gas portador: helio (100 kpa), 18,5 cm/s.
- Temperatura inyector y detector: 250°C.
- Detector: FID.

A continuación, en las figuras 6.6, 6.7 y 6.8, se presentan tres cromatogramas parciales de los VOCs que aparecen en primer lugar, lo que permite realizar una comparación adecuada, para sacar conclusiones de la evolución y duración de la extracción.

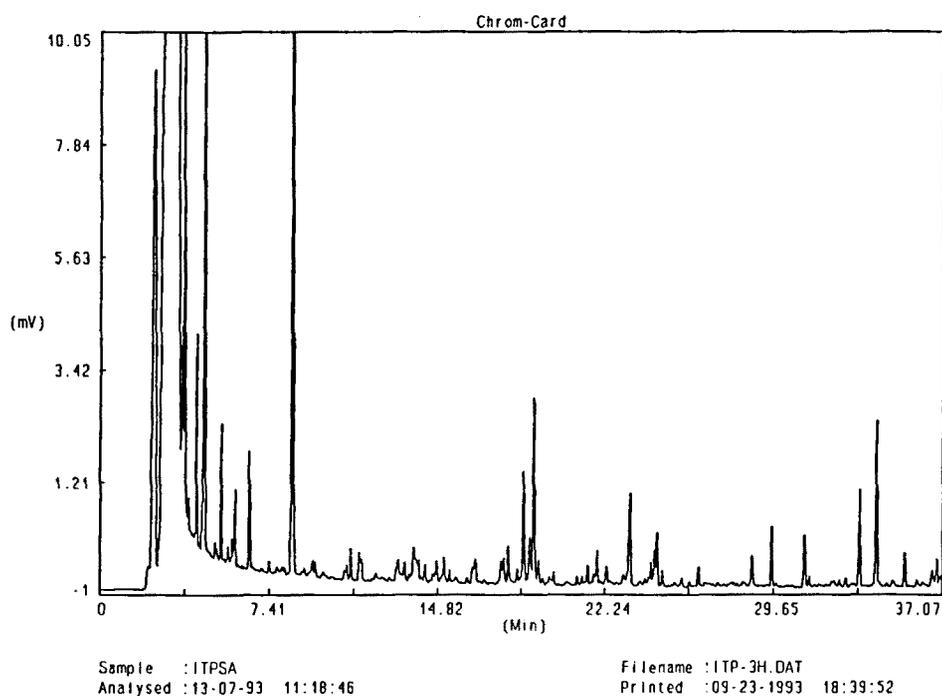


Figura 6.6 Cromatograma después de 3 horas de extracción.

Se observa que las alturas relativas de los VOCs con menores tiempos de retención se estabilizan antes que las correspondientes a las de los VOCs con mayores tiempos de retención, estos últimos son los que marcan el fin de la extracción, como ya se ha visto

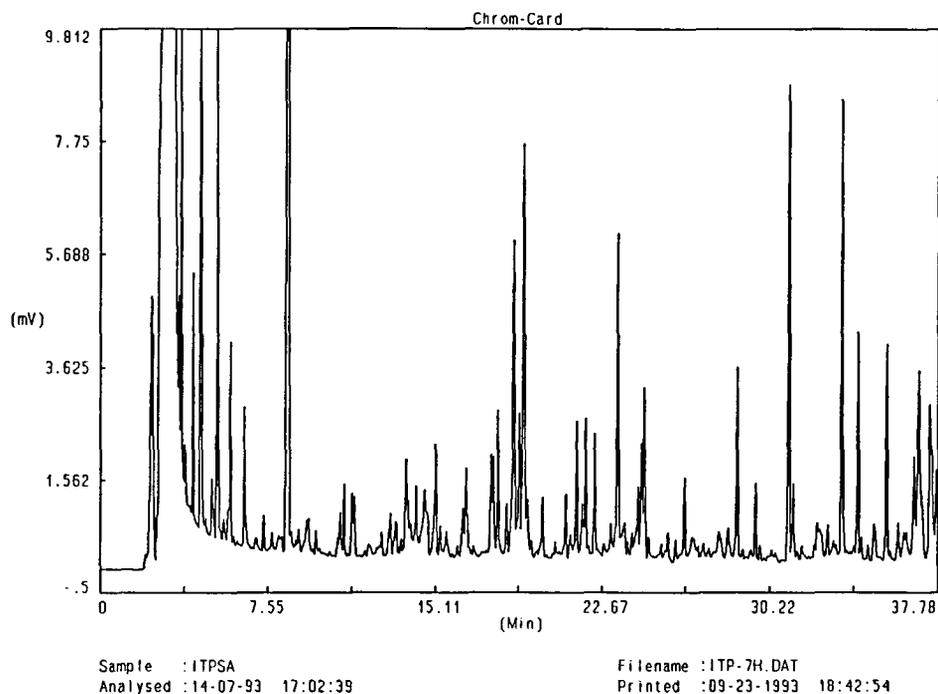


Figura 6.7 Cromatograma después de 7 horas de extracción.

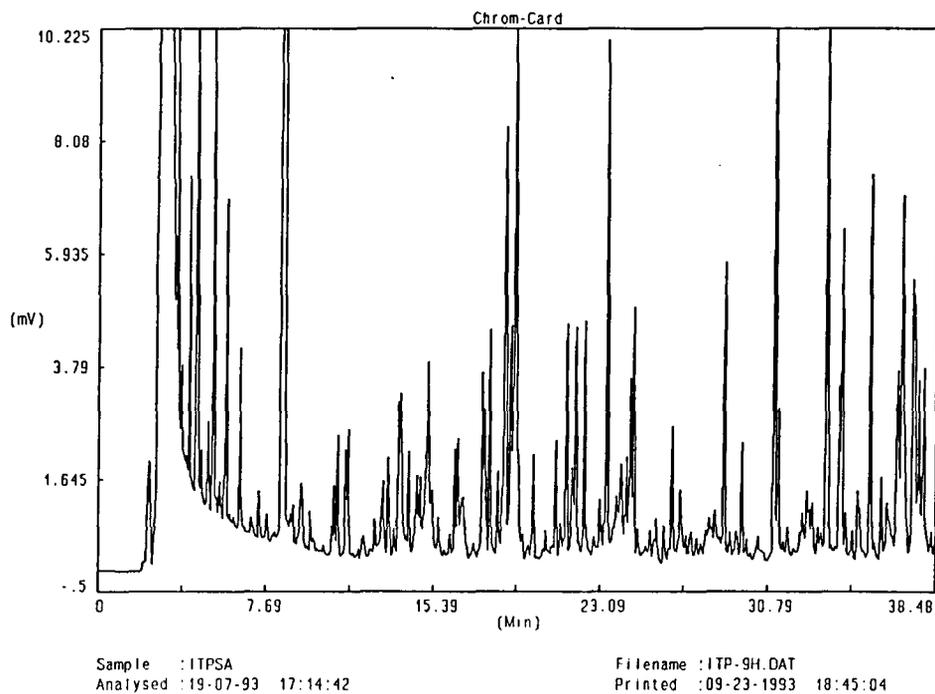


Figura 6.8 Cromatograma después de 9 horas de extracción.

antes. La figura 6.9 muestra el cromatograma completo con todos los compuestos orgánicos volátiles extraídos.

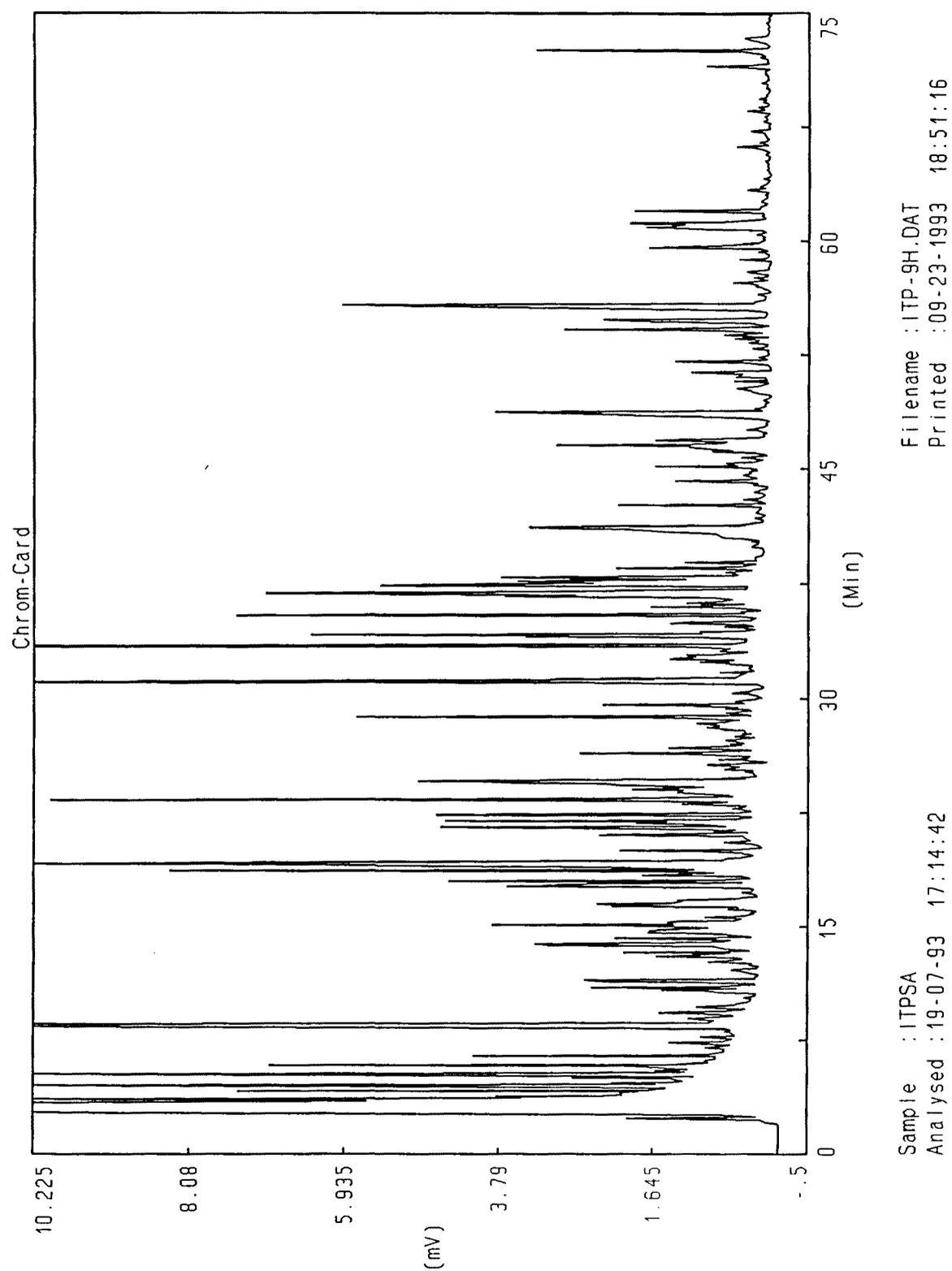


Figura 6.9 Cromatograma completo después de 9 horas de extracción.

## 6.6 Extracción de la muestra S-420 a presión atmosférica

La figura 6.10 presenta el cromatograma correspondiente a los VOCs obtenidos por el método de extracción de Likens y Nickerson, que servirá para posteriores comparaciones.

La carga de extracción ha sido la siguiente:

- Oleorresina de pimentón: 151,1 g.
- Agua: 295,2 g.
- Relación agua/oleorresina: 2:1.
- Disolvente: hexano.
- Tiempo de extracción: 11,5 horas.

La presencia de agitación mecánica ha permitido realizar una extracción sin ningún tipo de problemas en lo que se refiere a formación de espuma, ni aparición de salpicaduras durante todo el tiempo en que se ha producido la ebullición. La agitación se ha mantenido a la menor velocidad posible permitida por el agitador.

Las condiciones cromatográficas para la obtención del cromatograma correspondiente a la figura 6.10 son las siguientes:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Programa de temperaturas:  
35° (isoterma durante 6 minutos) hasta 250° (3°/min), isoterma a 250° (2 minutos).
- Inyección: 3  $\mu\text{l}$ .
- Split 18:1.
- Gas portador: helio a 1 ml/min (75 kpa), 14 cm/s.
- Temperatura inyector: 250°C.
- Detector: 275°C.
- Detector: FID.

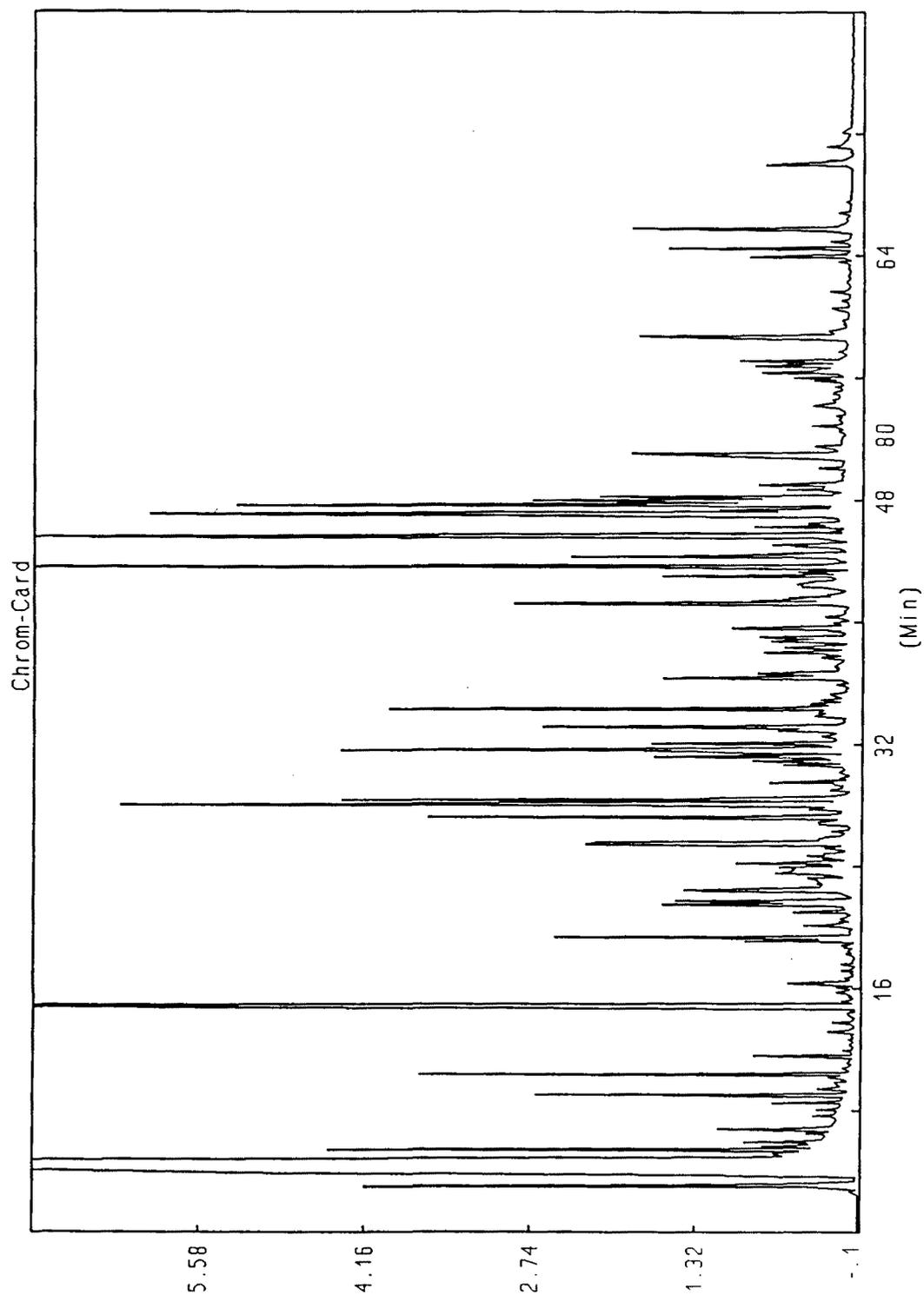


Figura 6.10 Cromatograma de los volátiles de la muestra S-420 extraídos mediante Likens-Nickerson.

## 6.7 El método de Likens y Nickerson aplicado a la extracción de los VOCs de la oleorresina de pimentón (método a presión reducida)

El sistema utilizado es similar al descrito anteriormente a presión atmosférica, con la salvedad fundamental de utilizar una presión absoluta considerablemente inferior en el sistema, lo que conduce, en primer lugar, a una reducción considerable de la temperatura de trabajo, con todas las consecuencias que esta situación comporta.

En este apartado se indicarán únicamente aquellos aspectos que difieren del método aplicado a presión atmosférica, para evitar la repetición de conceptos muy similares.

El primer problema que aparece es evitar la pérdida de VOCs que, debido a la baja presión, no sea posible condensarlos. Para evitarlo, se ha añadido al sistema una trampa de condensación que consiste en mantener de forma continuada una disolución de acetona y anhídrido carbónico, ello asegura que no se producirá la fuga de ningún volátil hacia la bomba de vacío, cuyas características son las siguientes:

- Caudal: 3 m<sup>3</sup>/h.
- Potencia: 0,25 CV a 2.800 rpm.

Para conocer la presión en el interior del equipo de extracción de Likens y Nickerson se ha empleado un manómetro diferencial de dos ramas en U, con mercurio como líquido manométrico; conociendo la presión atmosférica absoluta se determina la presión en el interior del equipo de forma inmediata. La presión de trabajo ha sido de 21,33 kPa (160 mm Hg) en el interior,. Se ha desestimado trabajar a presiones inferiores ya que se podría llegar a perder algún componente muy volátil, o también arrastrar aquellos compuestos que no presentan interés como aromas, debido a su elevada masa molecular.

La temperatura de ebullición del agua a la presión de 21,33 kPa (160 mm Hg) es de 62°C, aproximadamente, lo que supone un calentamiento muy inferior al que se debe llegar en el caso de trabajar a presión atmosférica, en la que la temperatura del matraz que contiene la mezcla de oleorresina de pimentón y agua supera los 100°C.

Se ha elegido nuevamente el hexano como disolvente, a pesar de las complicaciones que conlleva, debido a su bajo punto de ebullición (69°C a presión atmosférica), ello permite comparar los resultados de ambas extracciones con mayores paralelismos.

La agitación se ha llevado a cabo de forma magnética, de esta manera se evitan las posibles fugas que pueden presentarse si se utiliza la agitación mecánica, debido a las dificultades que presenta el sistema de agitación para ajustar de forma correcta. Se ha trabajado entre 300 y 500 revoluciones por minuto. No se ha presentado ningún problema en lo que se refiere a la formación de espuma, produciéndose una destilación de manera muy regular sin la aparición de salpicaduras.

## 6.8 Extracción de la muestra S-420 a presión reducida

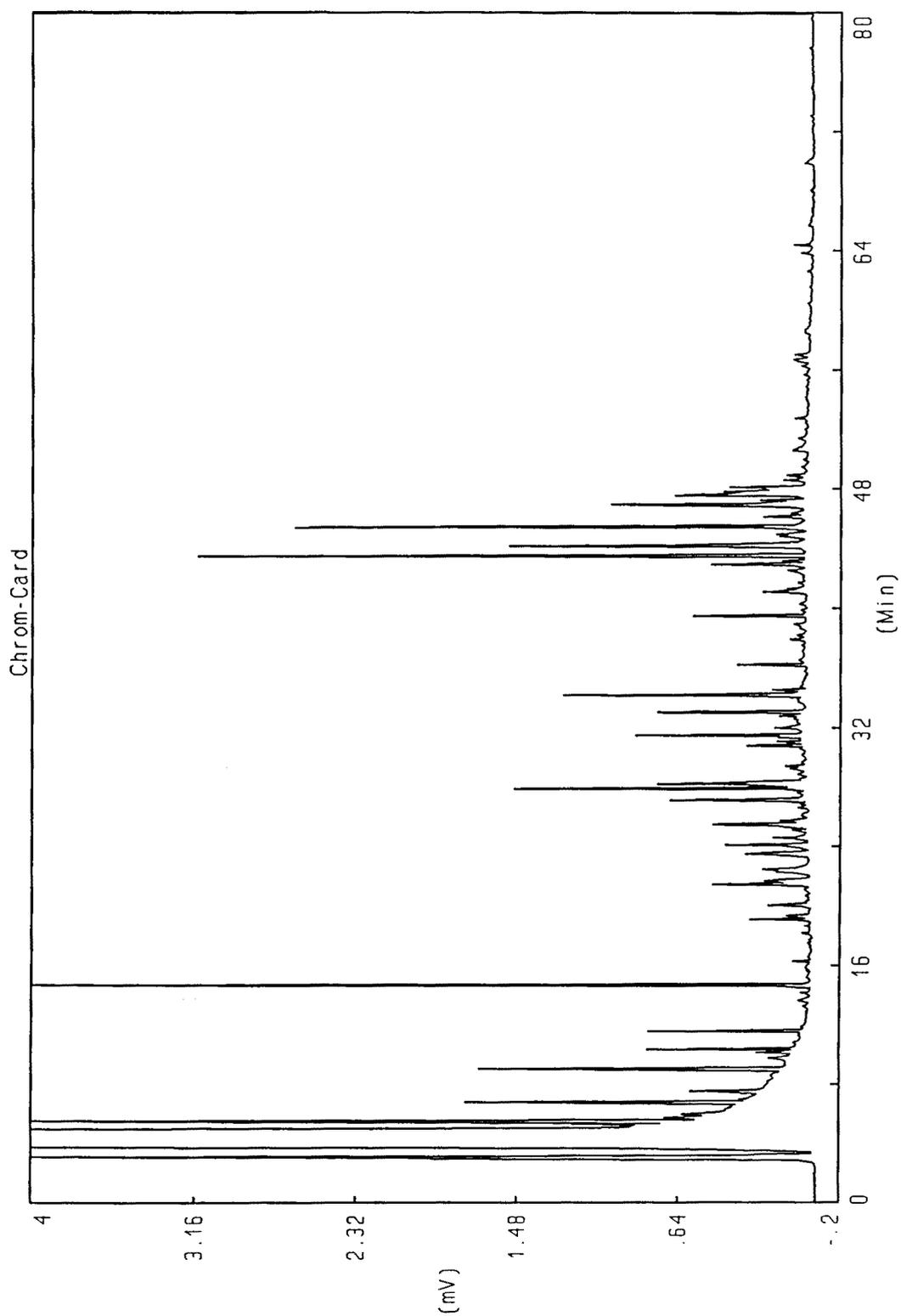
Las cargas para realizar la extracción han sido las siguientes:

- Oleoresina de pimentón: 75,4 g.
- Agua: 159,4 g.
- Relación agua/oleoresina: 2,11:1.
- Disolvente: hexano (8 ml).
- Tiempo de extracción: 6 horas.
- Presión absoluta: 21,33 kPa (160 mm Hg).
- Volúmen matraz: 500 ml.
- Temperaturas máxima y mínima de la trampa: -20°C y -80,5°C.

Los resultados de la extracción se muestran en el cromatograma de la figura 6.11.

Las condiciones cromatográficas empleadas para el cromatograma mencionado han sido las siguientes:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Programa de temperaturas:  
35° (isoterma durante 6 minutos) hasta 250° (3°/min), isoterma a 250° (2 minutos).
- Inyección: 3  $\mu\text{l}$ .
- Split 16:1.
- Gas portador: helio a 1 ml/min (75 kpa), 14 cm/s.
- Temperatura inyector: 250°C.
- Detector: 275°C.
- Detector: FID.

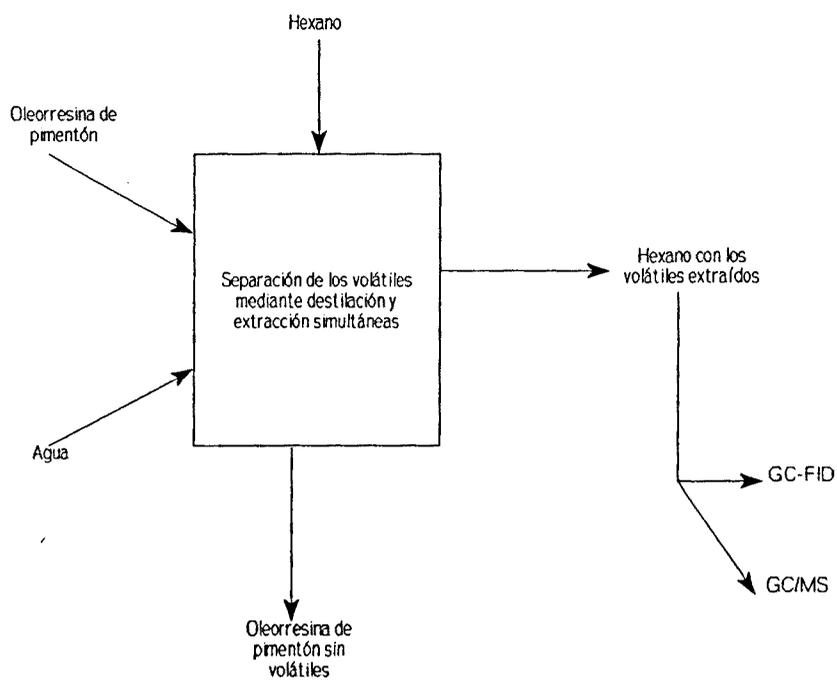


Filename : S420-160.DAT  
Printed : 04-11-1994 19:56:21

Sample : LN S-410(160)  
Analysed : 11-04-94 18:29:51

Figura 6.11 Cromatograma correspondiente a la extracción a 160 mm Hg de presión.

El esquema de trabajo seguido en todas las extracciones ha sido el siguiente:



## CAPÍTULO 7

# APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE HEADSPACE ESTÁTICO A LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN

---

### 7.1 Instrumentación

Para llevar a cabo la experimentación de esta técnica se ha dispuesto de viales que se pueden cerrar herméticamente mediante un septum con la parte inferior, que es la que se encuentra en contacto con los vapores de la muestra, recubierta de teflón. De esta manera se evita cualquier contaminación proveniente del septum. El mencionado septum consigue un aislamiento hermético mediante un cierre metálico, que se adapta perfectamente al cuello del vial mediante unas pinzas adecuadas. Dicha tapa metálica va provista de una lengüeta que, al levantarla, permite introducir la jeringa para tomar la muestra. Naturalmente, se ha procurado evitar la introducción de cuerpos extraños en el análisis, sometiendo tanto al vial como al septum a las condiciones máximas de limpieza (tratamiento con disolventes, temperaturas máximas permisibles en la estufa, etc.).

Se preparan diferentes muestras, que se introducen en el vial, al que se coloca en un baño termostático, de manera que pueda considerarse que la temperatura del líquido es la de la muestra. Para ello se deja durante un tiempo aproximado de una hora antes de la extracción de la mencionada muestra gaseosa. Para realizar la extracción de la misma, se utiliza una jeringa de cromatografía para muestras gaseosas. El volumen de la mencionada jeringa es de 1 ml. Unas pruebas preliminares han permitido observar que, al aumentar la temperatura del vial, los picos son más altos y aparecen en mayor cantidad en el cromatograma, lo que hace pensar en la bondad del método.

Para proceder a tomar la muestra debe aspirarse lentamente el volumen total de la jeringa, y, a continuación, comprimir el émbolo al máximo. La última operación se realiza con el fin de que, cuando se introduzca la muestra en el inyector del cromatógrafo de gases, no se produzcan colas en los picos, debido a una introducción lenta de la muestra. Hay que tener

en cuenta que antes de realizar la toma de muestra es conveniente calentar la jeringa hasta una temperatura próxima a la máxima permitida en sus instrucciones de uso con el fin de evitar que algún componente de la muestra pueda condensar en el cuerpo de la misma.

## 7.2 Análisis cromatográfico de las muestras gaseosas obtenidas mediante headspace estático

Hay que escoger el programa de temperaturas y la duración del análisis cromatográfico. En principio, se puede considerar que es aconsejable aplicar el mismo programa que para el estudio del headspace dinámico en todas sus variantes. La anterior elección puede considerarse correcta si se trata de comparar ambos resultados de forma paralela, aunque no es tan acertada si se tiene en cuenta los compuestos orgánicos volátiles que puedan aparecer, ya que el método de headspace estático permite aislar los VOCs cuyos puntos de ebullición son más bajos, por lo que ocuparán la primera zona del cromatograma, dejando sin picos las zonas correspondientes a tiempos más altos.

La no existencia de vapor de agua en las muestras, teniendo en cuenta el proceso de obtención de la oleorresina de pimentón, facilita mucho los análisis cromatográficos, puesto que el volumen que ocuparía dicho vapor viene ocupado por los VOCs presentes en la muestra, lo que aumenta la cantidad de los mismos y la facilidad de que se puedan detectar. Aunque la presencia de vapor de agua no dificultaría el análisis de la mencionada muestra, puesto que no hay que olvidar que el agua no genera señal alguna en el detector de ionización de llama, que es el que se ha utilizado en todos los análisis cromatográficos.

Las condiciones cromatográficas han sido exactamente las mismas que las utilizadas en los otros métodos de headspace para que se puedan efectuar comparaciones. Dichas condiciones han sido las siguientes:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu$ m.
- Programa de temperaturas:  
35° (isoterma durante 6 minutos) hasta 250° (3°/min), isoterma a 250° (2 minutos).
- Inyección: 1 ml.
- Split: 16:1.
- Gas portador: helio a 1 ml/min (75 kpa), 14 cm/s.
- Temperatura inyector: 250°C.
- Temperatura detector: 275°C.

- Detector: FID.

### 7.3 Desarrollo experimental

Para la aplicación de este método se han efectuado tres inyecciones por muestra, habiéndose escogido las temperaturas de 60, 80 y 100°C para las extracciones correspondientes. Hay que indicar que para escoger el rango de temperaturas para aplicar el método, se han realizado pruebas previas que han supuesto que se descarten temperaturas inferiores a los 60°C, y aún así ésta se considera muy baja en cuanto a rendimiento de VOCs. Todas las muestras utilizadas para los ensayos de este capítulo pertenecen a la oleorresina S-420, suministrada por ITPSA.

Asimismo, la realización de tres inyecciones por muestra permite desplazar el equilibrio de los vapores que se encuentran en el recipiente, por lo que los correspondientes cromatogramas presentan leves variaciones.

El vial donde se han introducido las muestras tiene un volumen de 43 ml, la cantidad de muestra introducida es de 1-2 g, aproximadamente, en cada caso, y el tiempo de espera para que se alcance el equilibrio térmico ha sido de 1 hora, como mínimo, en todas las situaciones.

Si bien por un lado el aumento de temperatura favorece la aparición de VOCs, se pueden alcanzar condiciones en que se favorezcan descomposiciones térmicas de algunos componentes de la oleorresina de pimentón, transformándose en VOCs algunos de ellos, que inicialmente presentan una elevada masa molecular, ya se ha indicado como las altas temperaturas favorecen la formación de VOCs.

#### Temperatura de extracción de 60°C

En este caso la cantidad de oleorresina cerrada herméticamente en el vial es de 1,64 g. Los resultados obtenidos son los que se muestran en el gráfico 7.1, en el que se superponen los resultados de forma tridimensional. Puede observarse que, a esta temperatura, no se observan demasiadas variaciones entre las tres inyecciones, lo que hace suponer que los compuestos que formaban parte del espacio de cabeza en la primera extracción y en las posteriores son los mismos, lo que indica que a esta temperatura ya no pueden aparecer más VOCs.

#### Temperatura de extracción de 80°C

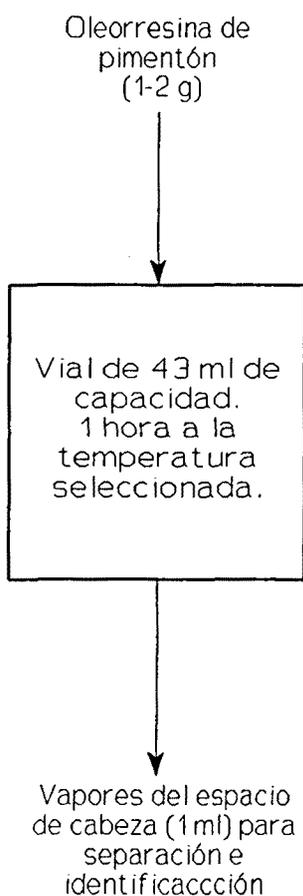
En este caso la cantidad de muestra contenida en el vial es de 1,70 g, procediéndose de la misma forma que en el caso anterior. La figura 7.2 presenta una nueva superposición en tres dimensiones de los cromatogramas obtenidos, correspondientes a las tres extracciones. Se puede observar que las alturas relativas han variado, disminuyendo la altura de los

compuestos más volátiles y aumentando la de aquellos que lo son menos.

### Temperatura de extracción de 100°C

En este caso la masa de la muestra es de 2,15 g. El procedimiento es igual al caso anterior, aunque el riesgo de descomposición de la muestra es mayor, debido a estar expuesta a una temperatura superior. La comparación tridimensional entre las tres extracciones se observa en la figuras 7.3. El último pico que aparece en el análisis crece a medida que se van extrayendo los vapores que se encuentran por encima de la oleoresina, debido a que se va desplazando el equilibrio, y va aumentando la concentración en compuestos menos volátiles.

El esquema de trabajo seguido durante todo el procedimiento de aplicación de headspace estático se representa a continuación:



En cualquier caso debe indicarse que cuando se han realizado más extracciones de la misma muestra, tal como se ha visto antes, se ha mantenido la mencionada muestra durante una hora más en el baño termostático para esperar que se restableciera de nuevo el equilibrio.

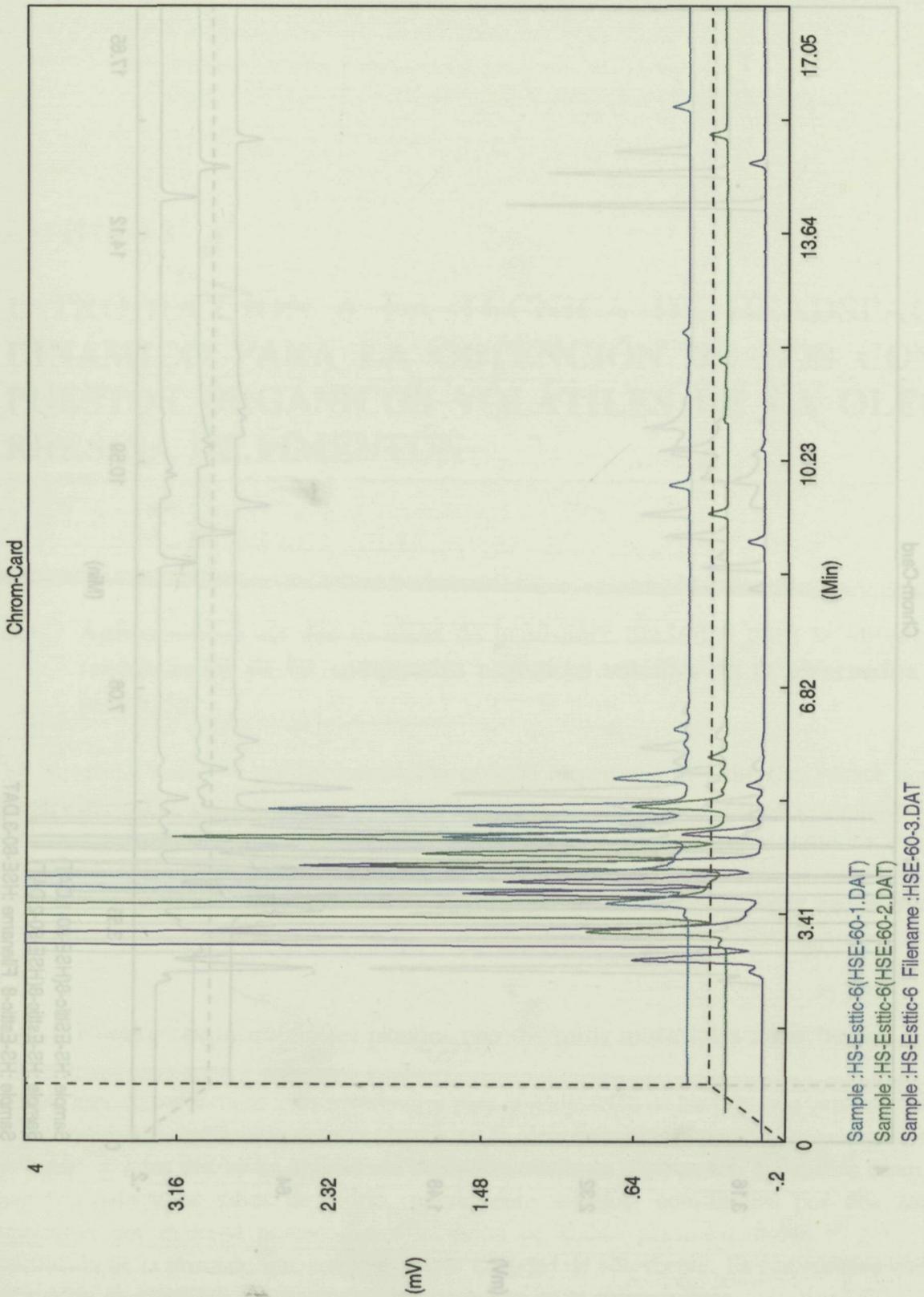


Figura 7.1 Superposición tridimensional de las tres extracciones sucesivas a 60°C.

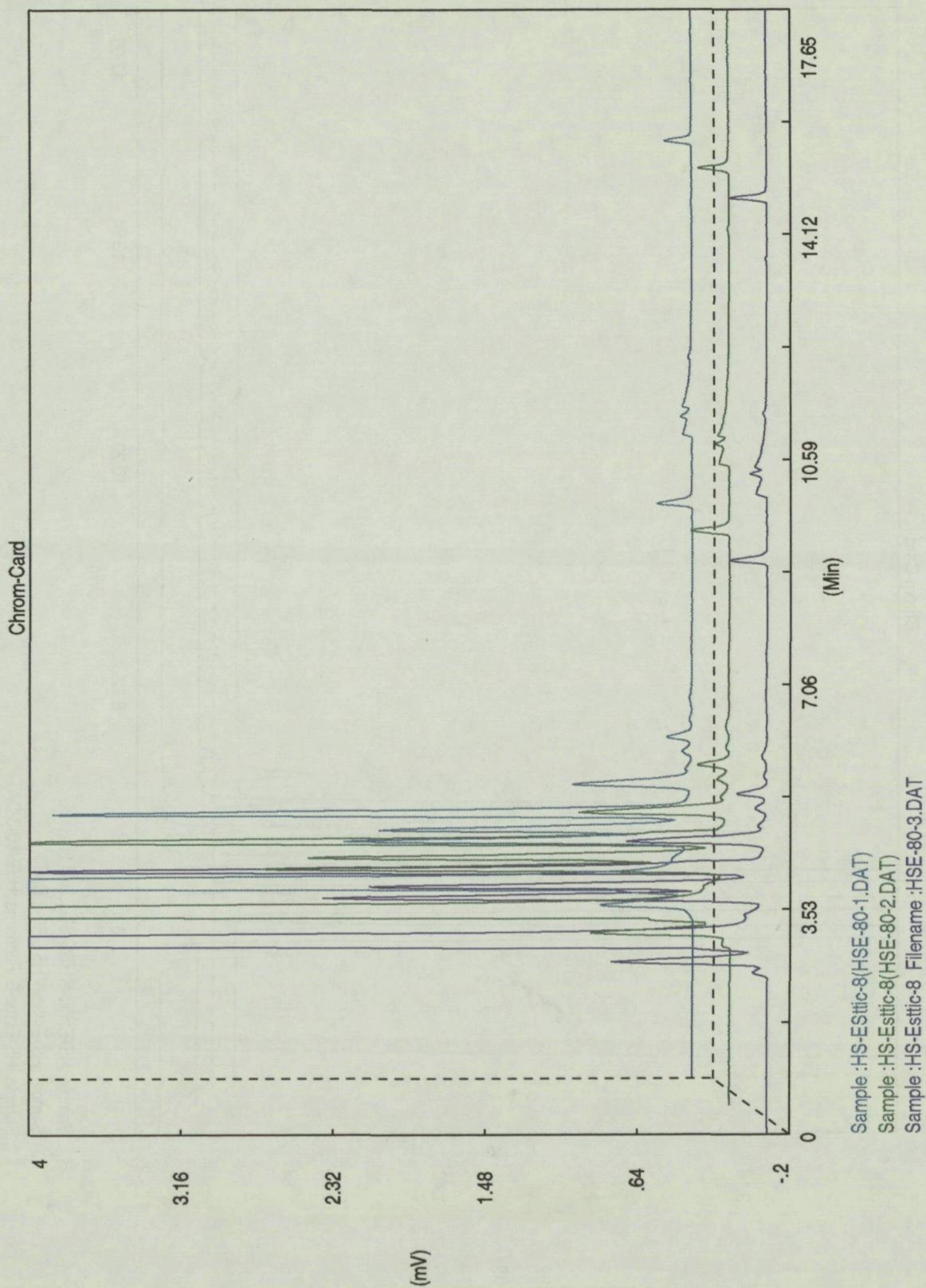


Figura 7.2 Superposición tridimensional de las tres extracciones sucesivas a 80°C.

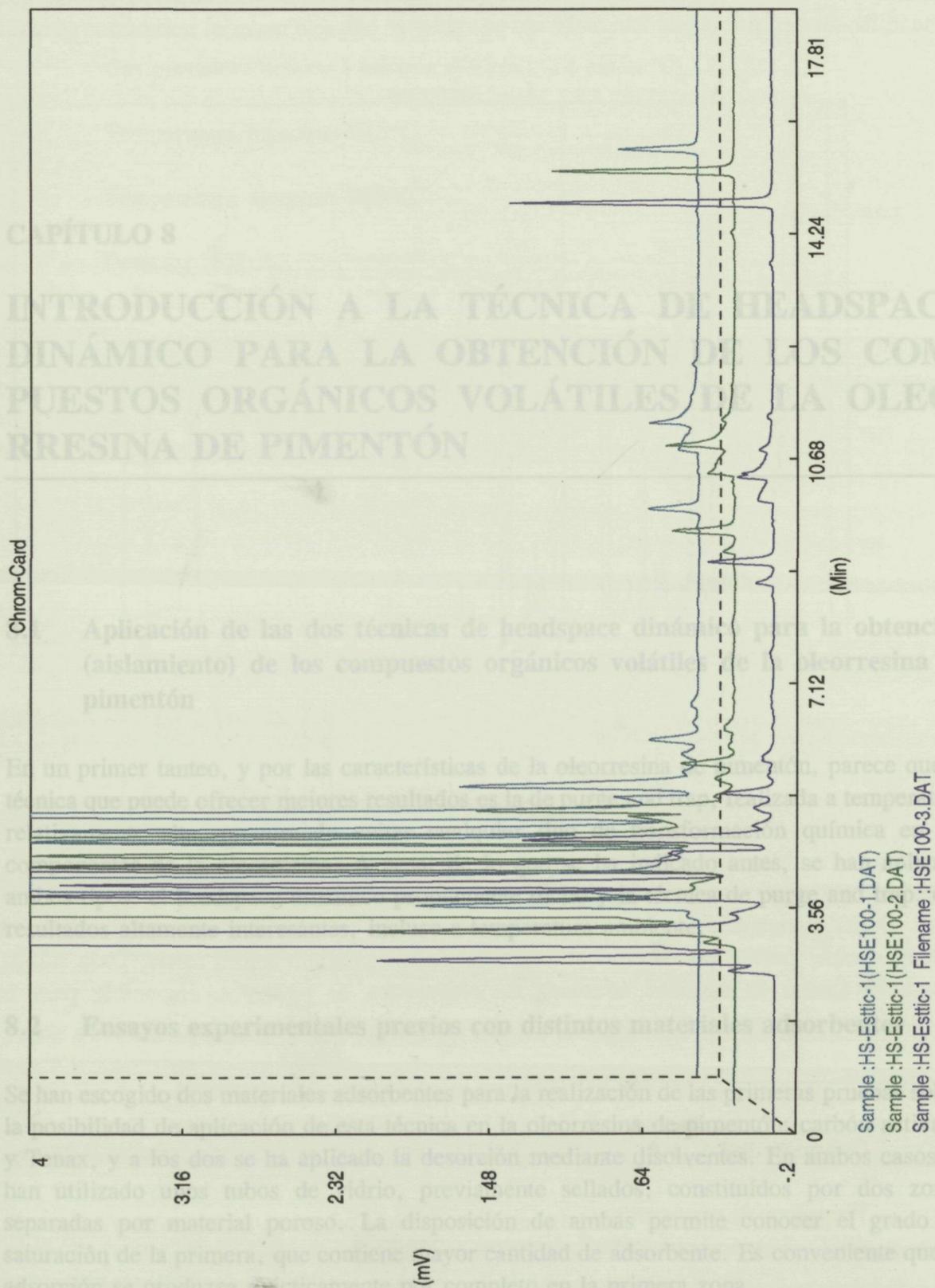


Figura 7.3 Superposición tridimensional de las tres extracciones sucesivas a 100°C.



## **CAPÍTULO 8**

# **INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE HEADSPACE DINÁMICO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

---

### **8.1 Aplicación de las dos técnicas de headspace dinámico para la obtención (aislamiento) de los compuestos orgánicos volátiles de la oleorresina de pimentón**

En un primer tanteo, y por las características de la oleorresina de pimentón, parece que la técnica que puede ofrecer mejores resultados es la de purge and trap, realizada a temperatura relativamente alta, procurando evitar cualquier tipo de transformación química en los componentes de la oleorresina. A pesar de lo que se ha indicado antes, se han aplicado ambos tipos: el headspace dinámico propiamente dicho y la técnica de purge and trap, con resultados altamente interesantes, incluso a temperatura ambiente.

### **8.2 Ensayos experimentales previos con distintos materiales adsorbentes**

Se han escogido dos materiales adsorbentes para la realización de las primeras pruebas sobre la posibilidad de aplicación de esta técnica en la oleorresina de pimentón: carbón activado y Tenax, y a los dos se ha aplicado la desorción mediante disolventes. En ambos casos se han utilizado unos tubos de vidrio, previamente sellados, constituídos por dos zonas separadas por material poroso. La disposición de ambas permite conocer el grado de saturación de la primera, que contiene mayor cantidad de adsorbente. Es conveniente que la adsorción se produzca prácticamente por completo en la primera zona.

La gráfica 8.1 permite observar que este método de obtención de volátiles puede generar

buenos resultados. La desorción del Tenax se ha realizado mediante hexano, disolvente que se ha utilizado siempre que se han realizado adsorciones con este material polimérico poroso.

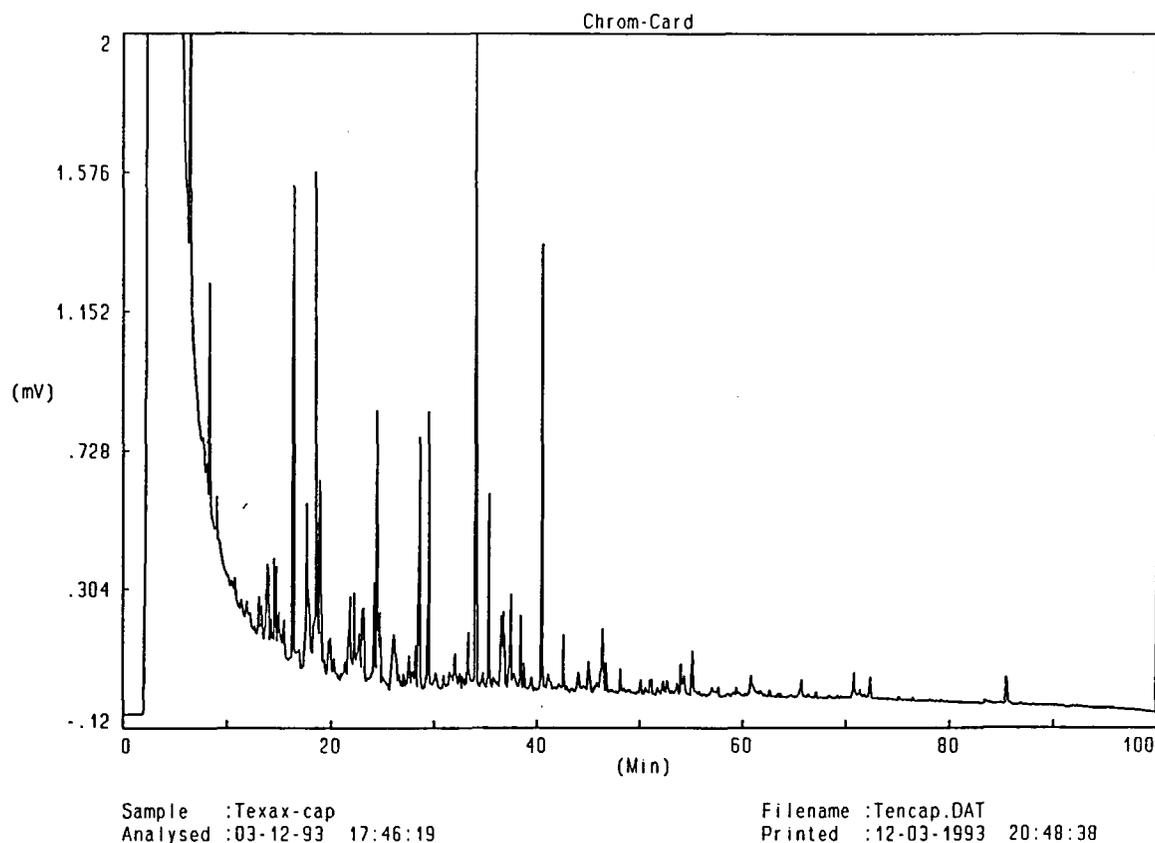


Figura 8.1 Cromatograma de la zona anterior de Tenax, desorbido con hexano.

También se ha obtenido un primer cromatograma de la zona posterior del tubo, figura 8.2, lo que permite observar la disminución del contenido en volátiles que se ha producido en esta zona. Dicha abundancia viene dada por la cantidad de muestra dispuesta para aplicar el arrastre-atrape, puesto que en pruebas anteriores se han saturado ambas zonas. Todo ello ha permitido ajustar la cantidad adecuada de oleoresina de pimentón disponible para la realización de la mencionada operación.

Las condiciones cromatográficas han sido, en los dos casos, las siguientes:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Programa de temperatura:  
40°C, 3°/min hasta 250°C, isoterma a 250°C.
- Inyección: 1 ml.

- Split: 10:1.
- Gas portador: helio a 1 ml/min (75 kpa), 14 cm/s.
- Temperatura inyector: 225°C.
- Temperatura detector: 250°C
- Detector: FID.

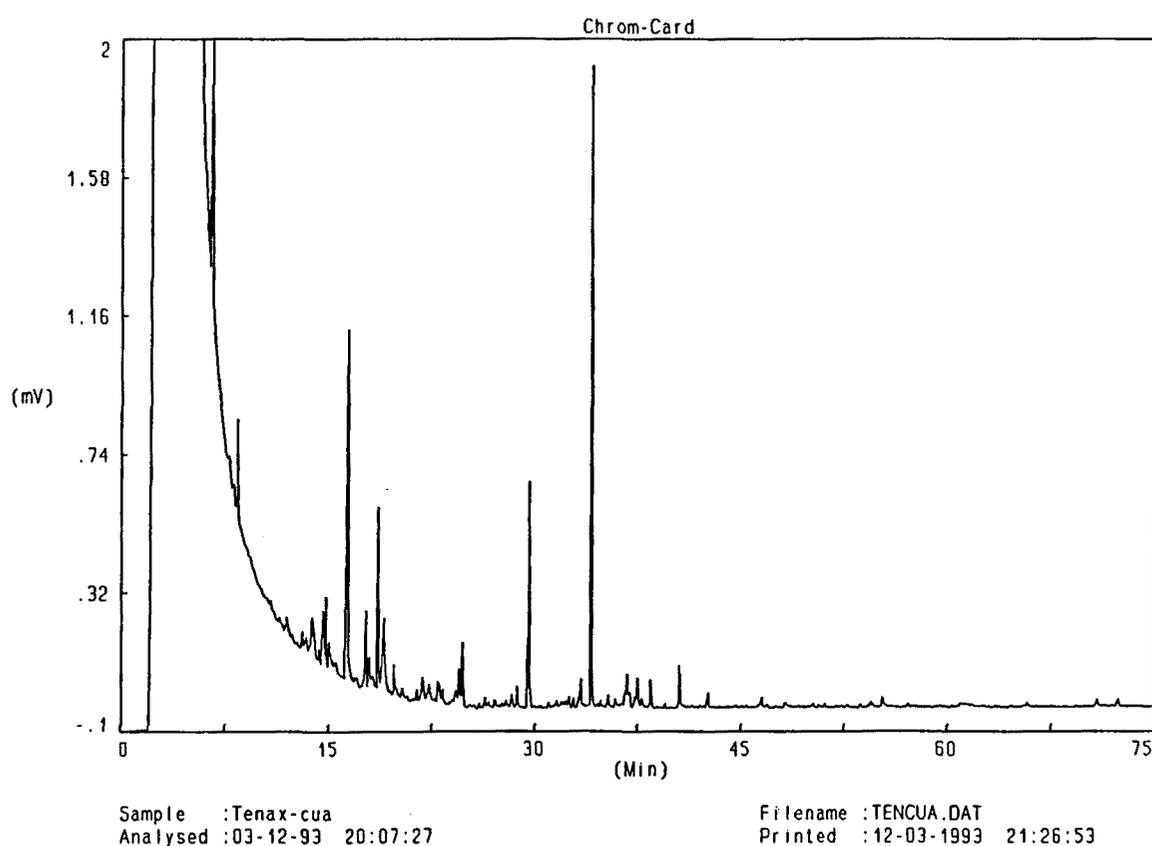


Figura 8.2 Cromatograma de la zona posterior del cartucho de tenax, desorbido con hexano.

Como era de esperar, la poca superficie por unidad de masa del Tenax presenta el problema de una rápida saturación de este adsorbente, lo que hace suponer que el empleo de carbón activado puede solventarlo, puesto que presenta una superficie específica mucho mayor.

Es esta primera prueba no se ha tenido en cuenta el grado de desorción alcanzado con el disolvente utilizado, hexano. Según Núñez et al. (1984), el Tenax es el adsorbente polimérico más utilizado, siendo recomendado para la adsorción de sustancias que aportan sabor a los productos naturales, aunque destaca el mismo problema que se ha detectado en esta experiencia: la baja capacidad de adsorción de los volátiles más ligeros de una muestra.

Debido a que se utilizará la desorción mediante disolventes, se considera que el empleo de carbón activado no resta eficacia a esta técnica, puesto que, como se ha dicho antes, su elevada superficie específica lo hace apropiado para este tipo de adsorción. Para ello se pone en contacto el material adsorbente con el disolvente adecuado, seguido de una centrifugación. Se utilizan disolventes de baja masa molecular. La cantidad de disolvente no debe ser muy baja, puesto que podría producirse una desorción incompleta; ni muy elevada, ya que se obtendría una solución muy diluída de volátiles, lo que comporta problemas en el momento del análisis cromatográfico y posterior espectrometría de masas. La desorción con sulfuro de carbono presenta la ventaja adicional de que el detector de ionización de llama no presenta una sensibilidad muy elevada a este compuesto.

Se presenta una ventaja fundamental mediante la desorción con disolventes, y es que se pueden realizar diversas inyecciones de la misma muestra, lo que produce un análisis más exacto. También es adecuado indicar el inconveniente que presenta el pico del disolvente, ya que puede enmascarar algunos volátiles que aparecen en primer lugar. Naturalmente, se han tenido en cuenta todas las precauciones necesarias que hay que tomar cuando se trabaja con disolventes: controlar la pureza de los mismos, almacenar las muestras en la nevera, etc.

### 8.3 Planificación para la experimentación de la técnica de headspace dinámico

Atendiendo a los primeros resultados, indicados en el apartado anterior, se ha utilizado carbón activado como material adsorbente. Para su realización se ha escogido el denominado ORBO-32 (large), suministrado por Supelco, a través de Teknokroma, sus representantes en España. La figura 8.3 muestra sus características constructivas más importantes:

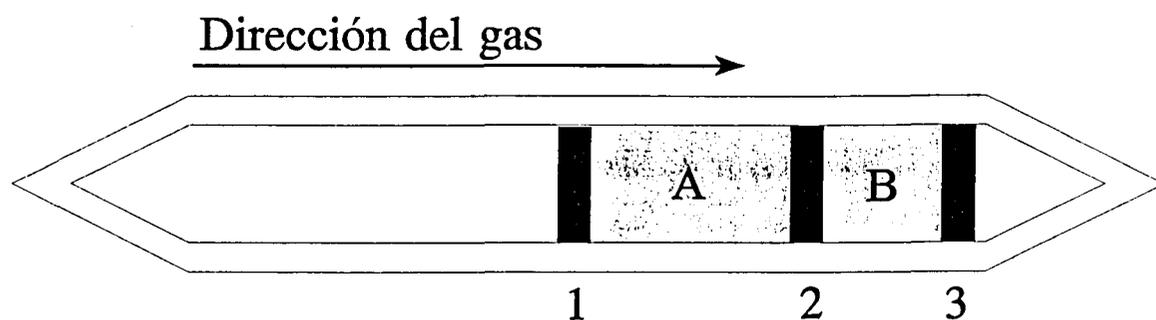


Figura 8.3 Tubo ORBO-32 para la adsorción.

Dimensiones:

Diámetro exterior: 6 mm.

Diámetro interior: 4 mm.

Longitud: 7 cm.

Los compartimentos A y B contienen la sustancia adsorbente, en este caso carbón de coco activado, las separaciones entre los lechos adsorbentes están constituidas por las siguientes sustancias: 1) lana de vidrio silanizada, 2) y 3) espuma de uretano.

En el compartimento A se encuentran 400 mg de carbón activado, y en el compartimento B hay 200 mg de carbón activado. Los caudales recomendables para el uso de los tubos ORBO-32 se encuentran entre 50 y 1000 ml/min.

El método de trabajo, en los dos tipos de headspace, ha consistido en hacer circular nitrógeno, que se ha utilizado siempre como gas inerte de arrastre, a tres temperaturas distintas durante un tiempo suficiente que permita suponer que el arrastre de los volátiles ha sido el máximo posible. Se ha intentado llevar a cabo cada experiencia de manera continua, aunque en ocasiones se ha debido de interrumpir para seguir con la operación al día siguiente, aunque esta situación no debe influir para nada en el proceso de extracción.

El montaje que se ha utilizado es similar en ambos casos, como se podrá observar en las figuras correspondientes. De cualquier forma, los detalles de trabajo se encuentran comentados en el correspondiente apartado.

A pesar de que diversos autores consideran estas técnicas como muy similares en su finalidad, que es la de atrapar los volátiles en trampas de sólidos adsorbentes, aplicando una desorción posterior, que puede ser térmica o mediante disolventes, en este trabajo se ha optado por tratarlas separadamente. Por razones de la propia realización experimental, se prefiere comparar resultados dentro de cada técnica a diferentes temperaturas, aunque más adelante se presenten conclusiones globales, relacionando las diferentes técnicas.

## 8.4 Bibliografía

- [1] J. Alberola y L. Izquierdo. "La fracción aromática del zumo de naranja. II. Análisis del espacio de cabeza". *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **19** (1979), 327-337.
- [2] J.L. Guinamant. "Extraction des composés volatils et/ou semi-volatils". *Analisis Magazine* **20**, (1992), M43-M45.
- [3] A. Mateos y E. Carbonell. "Análisis de la fracción aromática de alimentos. Técnicas de extracción y concentración". *Rev. Agroquím. Tecnol. Alim.* **30** (1990), 431-444.
- [4] M.T. Morales, R. Aparicio y F. Gutiérrez. "Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles en aceites vegetales". *Grasas y Aceites* **43** (1992), 164-172.
- [5] W.W. Nawar. "Some considerations in interpretation of direct headspace gas chromatographic analyses of food volatiles". *Food Technol.* **20** (1966), 213-215.
- [6] A.J. Núñez, L.F. González and J. Janák. "Pre-concentration of Headspace for Trace Organic Analysis

by Gas Chromatography". *J. Chromatographic Science* **300** (1984), 127-162.

- [7] C.L. Paul Thomas. "Sample Preparation Perspectives: Sampling for Volatile Species". *LC-GC Intl.* **6** (1993), 8-12.
-

## CAPÍTULO 9

# LA TÉCNICA DE ARRASTRE Y ATRAPE (PURGE AND TRAP) APLICADA AL AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN

---

### 9.1 Realización experimental

El esquema de trabajo seguido, con el fin de obtener resultados comparables, ha consistido en aplicar el método de purge and trap a oleorresina de pimentón procedente de una misma extracción industrial. En este caso se ha utilizado la oleorresina cuya referencia es S-420, suministrada a través de ITPSA.

Se han escogido tres temperaturas que resulten representativas, cuyos valores son de 30°C, 50°C y 81°C, con las dos primeras temperaturas no hay problemas de transformaciones químicas de los VOCs, el tercer valor se ha escogido próximo al del método de Likens y Nickerson, aunque por debajo de su temperatura de aplicación. Se ha utilizado nitrógeno como gas inerte de arrastre, de igual pureza al utilizado para cromatografía de gases. Como adsorbente se han utilizado los cartuchos de carbón activado ORBO-32 (large), cuyas características se han indicado anteriormente. El caudal de gas se ha mantenido entre los 60 y los 90 ml/min.

La figura 9.1 muestra la disposición del sistema de extracción de purge and trap. Para mantener una agitación constante se ha empleado un agitador magnético, que se ha mantenido a 700 rpm, y que también ha proporcionado el calor necesario para mantener la temperatura en los valores deseados. Se ha sumergido el recipiente en un vaso con una disolución de glicerina en agua.

El control de la temperatura se ha realizado de forma constante. Para la medición del caudal

se ha instalado un medidor de burbuja, que se ha utilizado de forma intermitente. El tubo con el gas es de nylon, y se ha introducido hasta el fondo de la oleoresina. La cantidad de oleoresina que se ha utilizado para cada extracción se ha ajustado teniendo en cuenta la capacidad de adsorción del carbón activado, después de diversas pruebas. Se ha evitado que el compartimento B delate presencia excesiva de VOCs, lo que supondría que el carbón que se encuentra en el compartimento A está saturado. El tiempo de paso de nitrógeno se ha tomado superior al mínimo necesario para poder asegurar un arrastre completo de los VOCs. Para fijar este tiempo mínimo, se han efectuado pruebas previas.

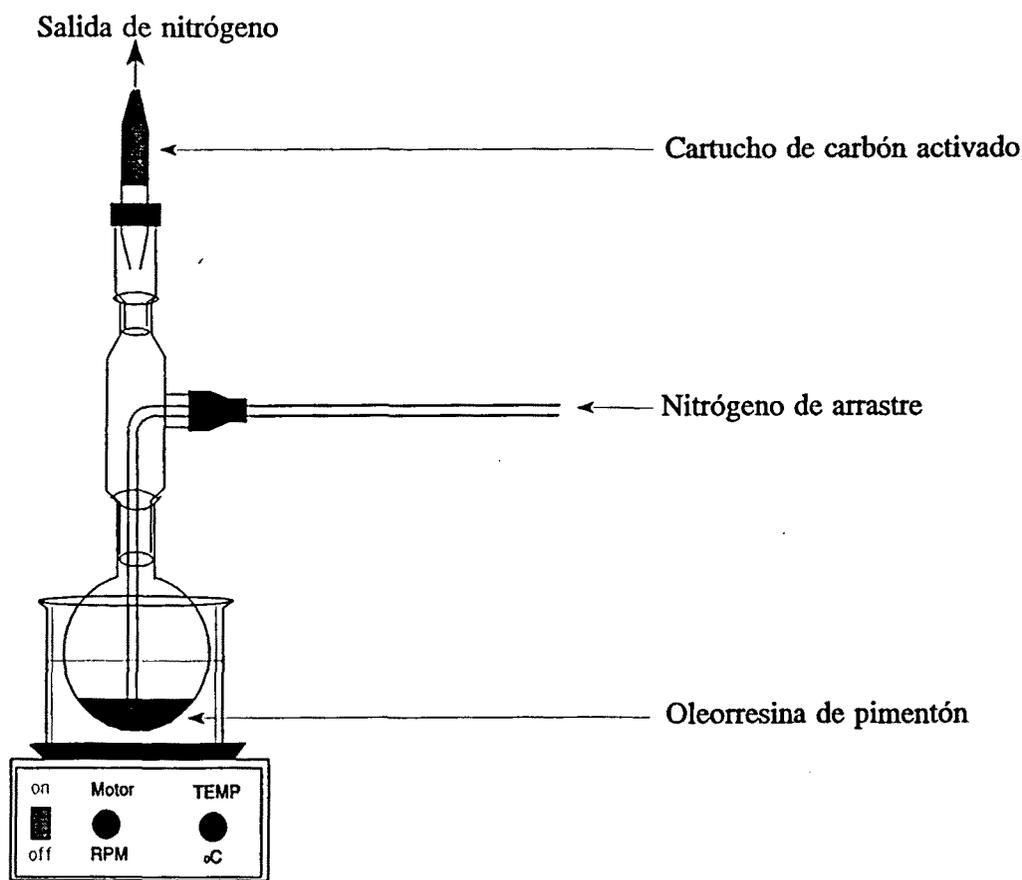


Figura 9.1 Sistema de extracción para la técnica de purge and trap.

Hay que indicar que el comportamiento físico de la oleoresina de pimentón favorece el arrastre de VOCs cuando la temperatura aumenta, debido a que se produce una disminución de la viscosidad. La mayor fluidez de la oleoresina favorece la acción del nitrógeno en el seno de la misma, permitiendo que se difunda con mayor facilidad; asimismo, hace que la agitación sea más homogénea. Una vez finaliza la extracción, se recuperan los VOCs mediante la desorción del carbón activado hasta completar un volumen total de 1,6 ml de sulfuro de carbono.

Las cargas, caudal de nitrógeno y tiempo de extracción para cada una de las experiencias a

distintas temperaturas han sido las que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 9.1

Temperatura	Carga	Caudal de N <sub>2</sub>	Tiempo
30°C	27,8 g	60-90 ml/min	12 horas
50°C	31 g	60-90 ml/min	12 horas
81°C	28,9 g	60-90 ml/min	12 horas

## 9.2 Análisis cromatográfico de la extracción mediante la técnica de purge and trap

Para realizar la separación cromatográfica en las tres extracciones se han empleado las siguientes condiciones, que permiten hacer comparaciones con otras extracciones, realizadas de modo semejante:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu$ m.
- Programa de temperaturas:  
35° (isoterma durante 6 minutos) hasta 250° (3°/min), isoterma a 250° (2 minutos).
- Inyección: 3  $\mu$ l.
- Split 16:1.
- Gas portador: helio a 1 ml/min (75 kpa), 14 cm/s.
- Temperatura inyector y detector: 250°C.
- Detector: FID.

Para comparar los resultados más cómodamente, se han mantenido todas las variables de la inyección en los mismos valores, aunque una inyección de 3  $\mu$ l no sería necesaria para el caso del purge and trap a 81°C, también se podría realizar la inyección con una relación de split mayor. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 9.2, 9.3 y 9.4, que se presentan a continuación.

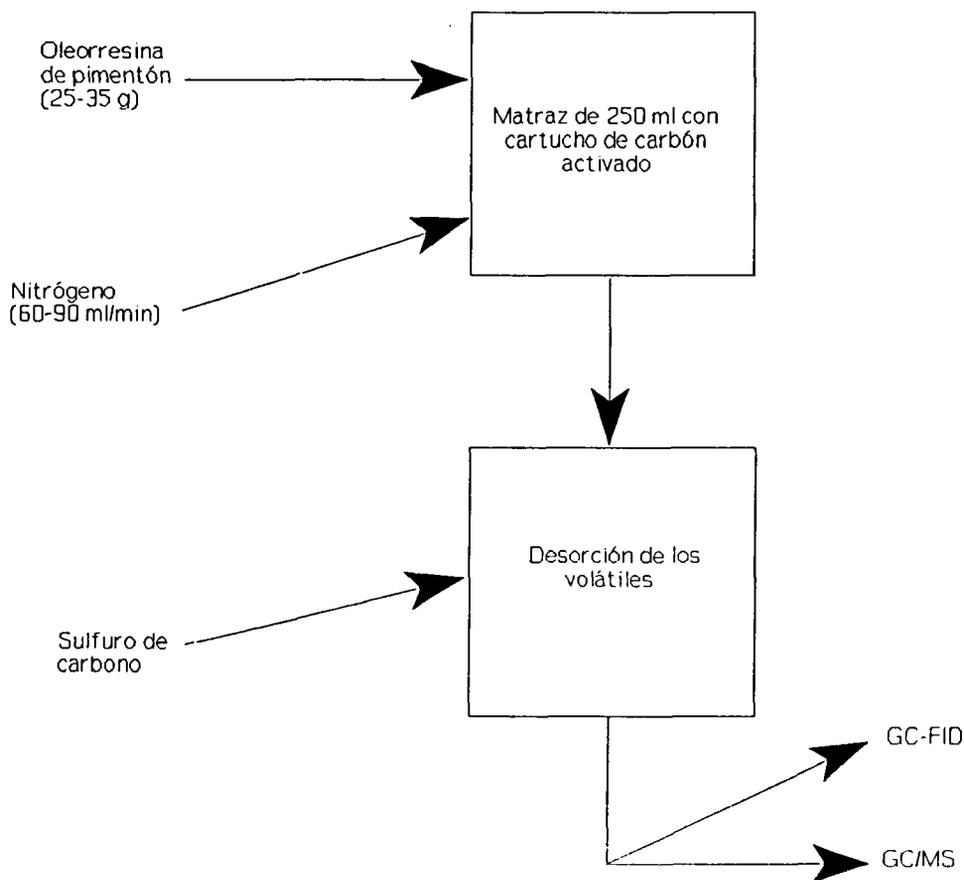
Para sacar conclusiones es conveniente observar la columna vertical que indica los mV, de

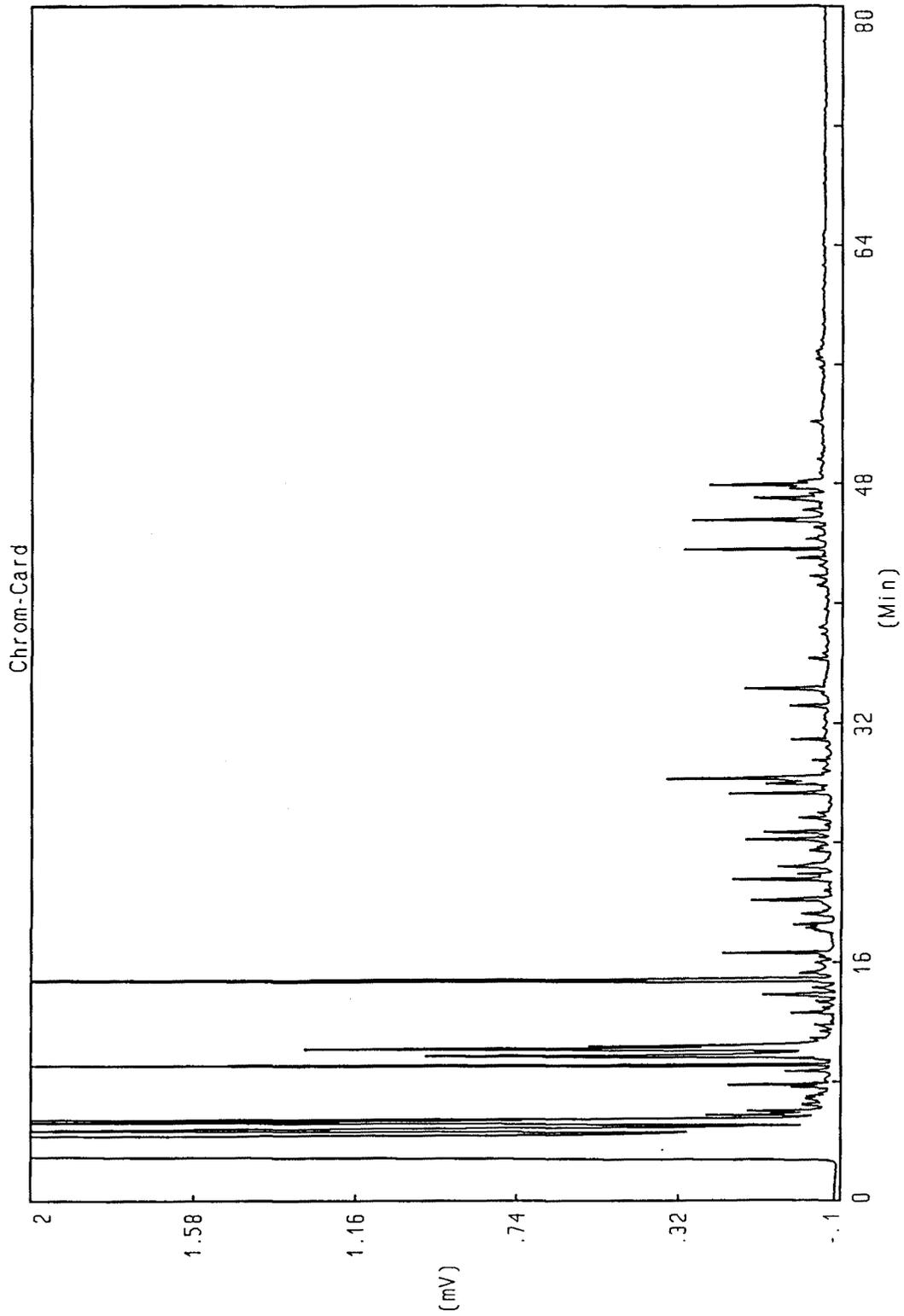
esta manera es fácil ver que en el caso de la extracción a 30°C (figura 9.2), los VOCs obtenidos se presentan en número bastante considerable, aunque en poca cantidad. En la figura 9.3, que representa los VOCs obtenidos a 50°C, se observa una mayor cantidad de los mismos, asimismo aparecen algunos que, o bien no eran arrastrados a 30°C, o bien, debido a su poca cantidad, no eran detectables.

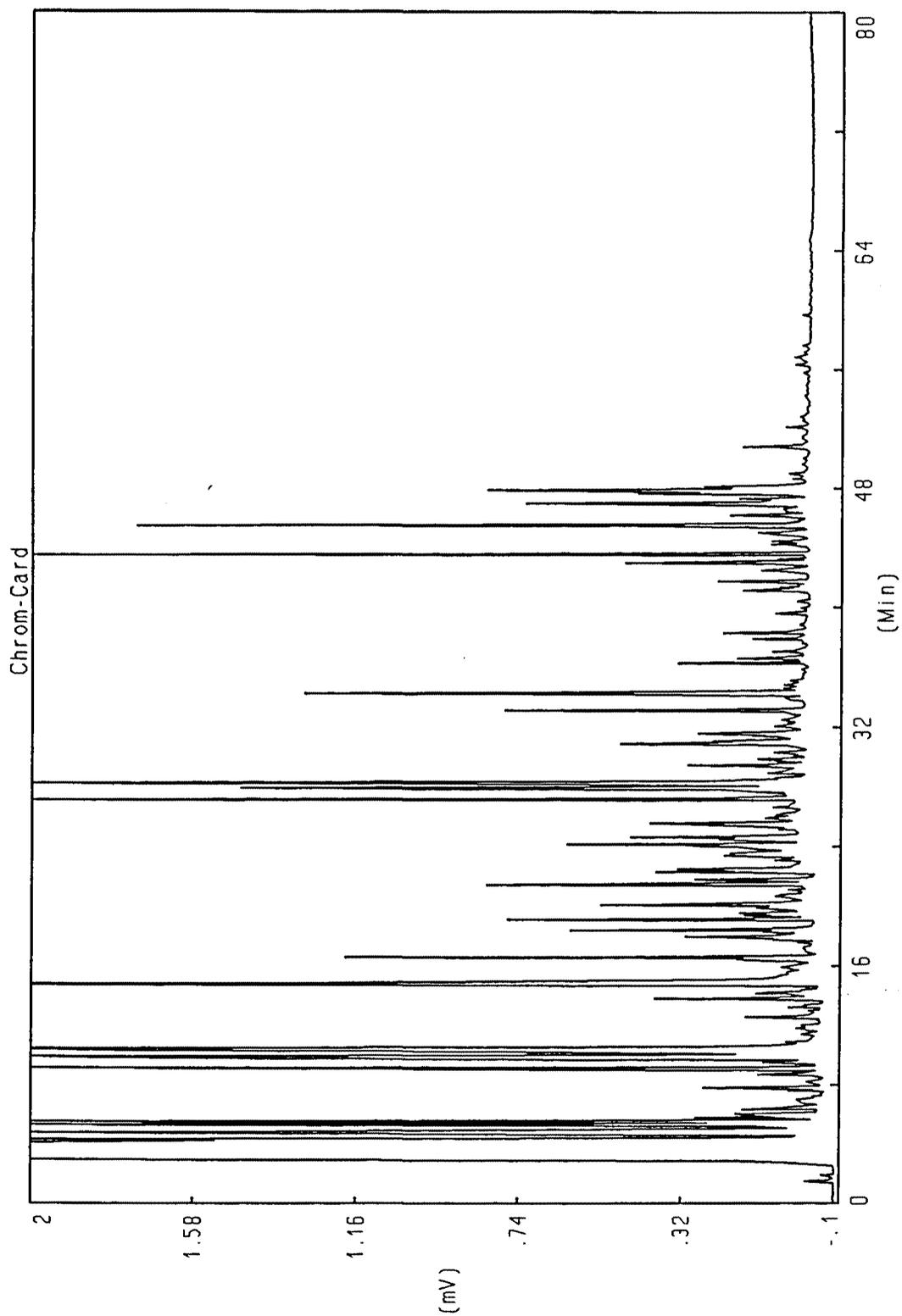
La figura 9.4, correspondiente a los VOCs a 81°C, presenta un mayor número de picos, así como una mayor cantidad de los mismos. Hay que considerar que esta temperatura está próxima a la temperatura a la que se lleva a cabo la extracción mediante el método de Likens y Nickerson, cuyos resultados paralelos se comentan en otro capítulo.

Para completar la comparación de resultados obtenidos a diferentes temperaturas, se incluye la figura 9.5 que contiene una superposición en tres dimensiones de una misma zona (en este caso de los 23,24 hasta los 47,09 minutos) correspondiente a los cromatogramas de las figuras 9.2, 9.3 y 9.4, y en la que se observa claramente que, tanto en cantidad como en nuevos VOCs, el método más adecuado es la extracción con el empleo de temperaturas elevadas.

El procedimiento seguido se presenta a través del siguiente esquema:



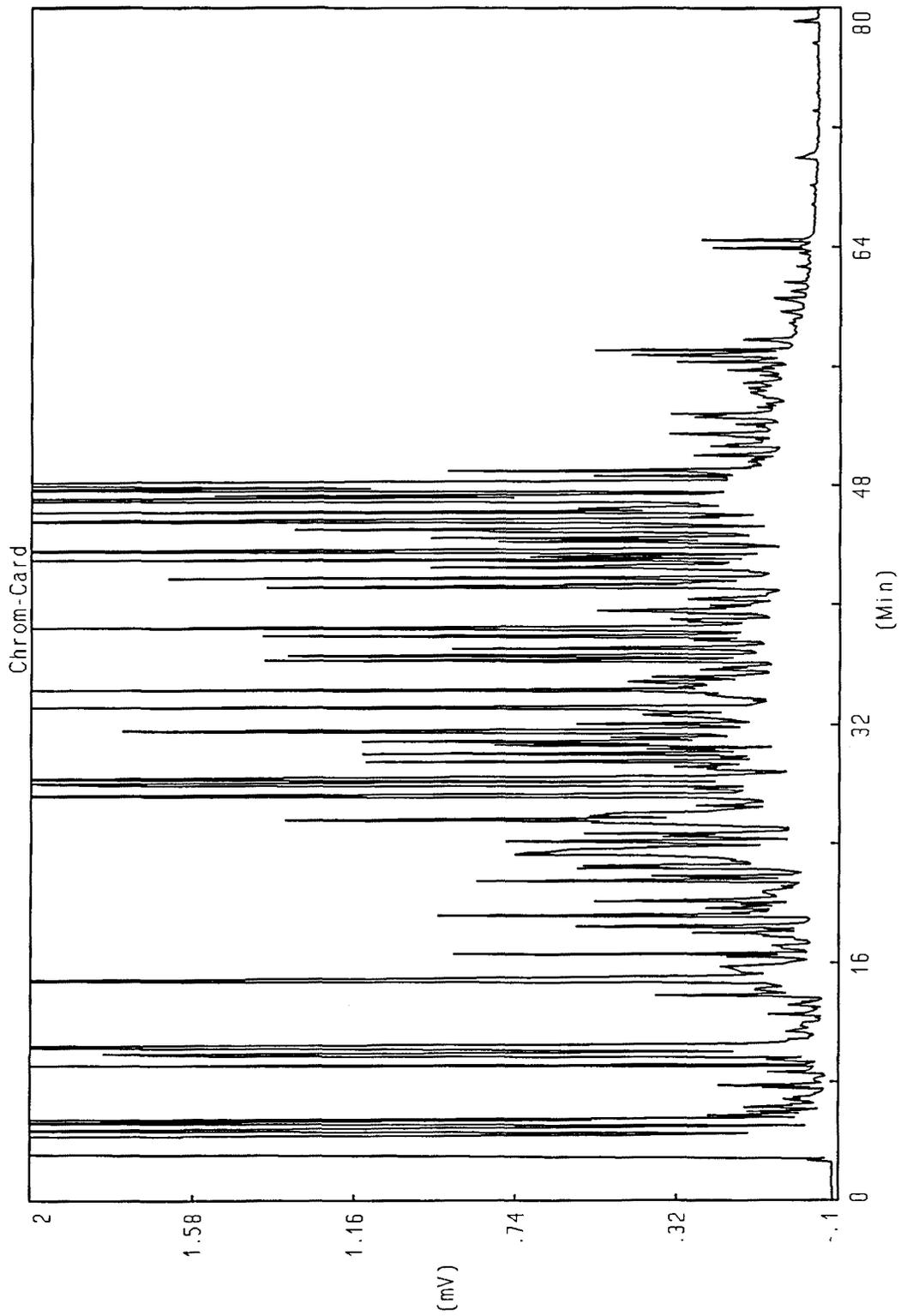




Sample : PT50S420  
Analysed : 22-02-94 14:02:51

Filename : PT50.DAT  
Printed : 02-23-1994 13:14:32

Figura 9.3 Cromatograma de los VOCs obtenidos por purge and trap a 50°C.



Sample : PT81S420  
Analysed : 22-02-94 17:21:47

Filename : PT81.DAT  
Printed : 02-23-1994 13:13:06

Figura 9.4 Cromatograma de los VOCs obtenidos por purge and trap a 81°C.

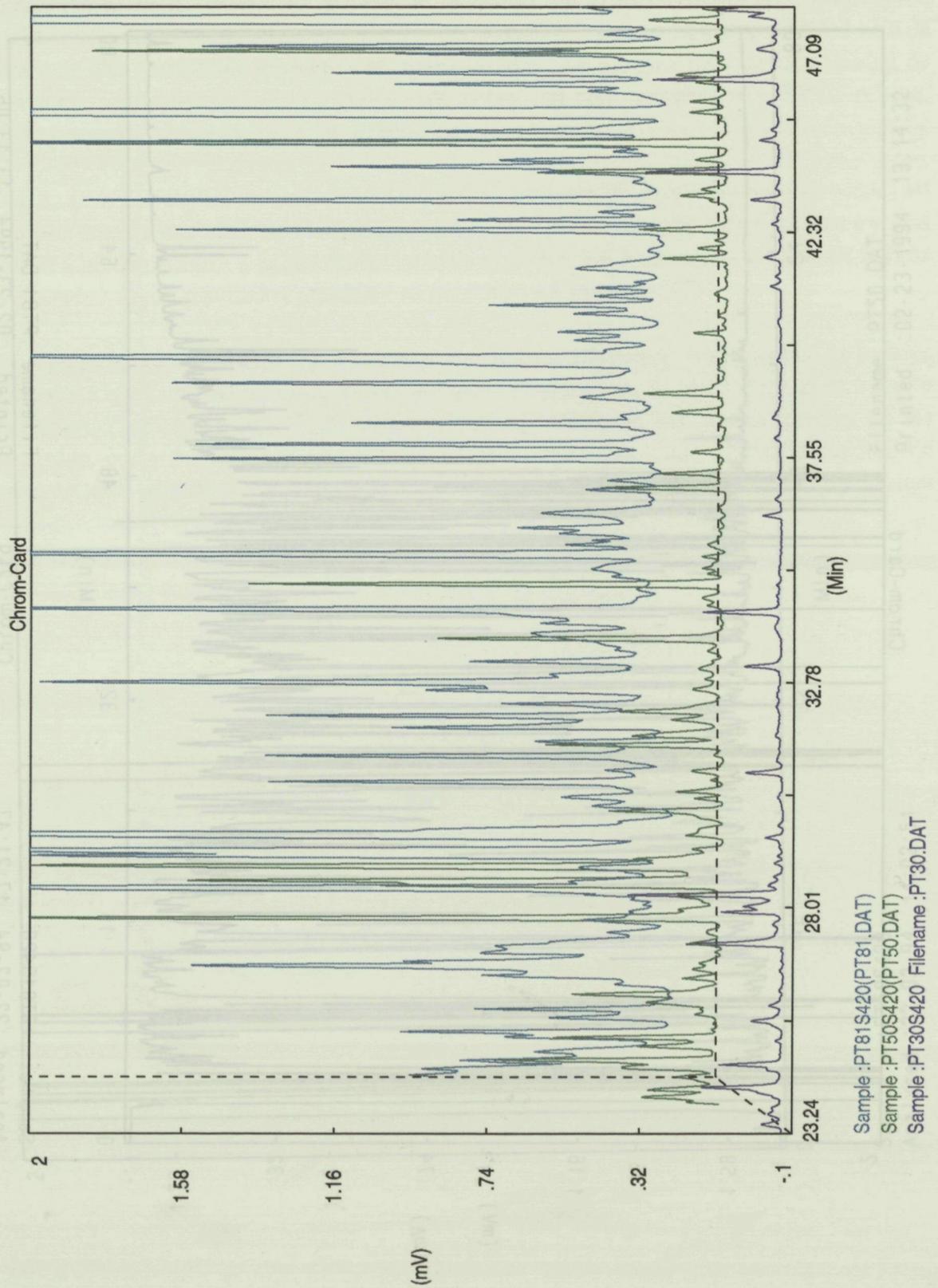


Figura 9.5 Comparación de los resultados obtenidos con las tres temperaturas de extracción.

Es importante comprobar la eficacia del sistema de adsorción que se ha empleado, en este caso el carbón activado, para ello se hace uso de la separación en dos compartimentos del citado carbón, procediendo a la desorción del segundo de los mismos, correspondiente a la operación de purge and trap realizada a 81°C, que es la que se ha llevado a cabo en las condiciones más extremas.

El cromatograma correspondiente a esta desorción se presenta en la figura 9.6, en la que se puede observar que, efectivamente, todos los VOCs han sido adsorbidos por el carbón activado presente en el primer compartimento, sin que éste llegue a estar saturado. En caso contrario, se detectaría la presencia de VOCs en este cromatograma.

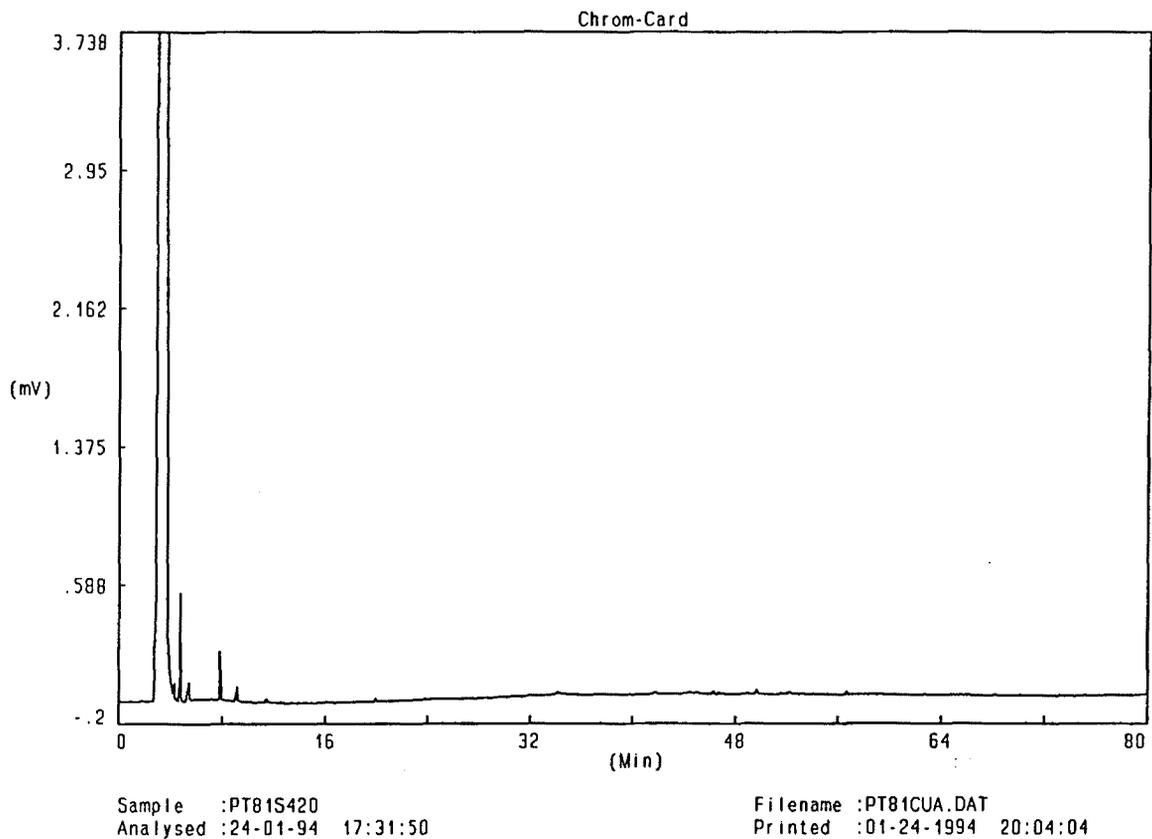


Figura 9.6 Cromatograma de la desorción de VOCs del segundo compartimento del carbón activado.



## CAPÍTULO 10

# LA TÉCNICA DE HEADSPACE DINÁMICO APLICADA AL AISLAMIENTO Y CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN

---

### 10.1 Realización experimental

Se ha aplicado la técnica de headspace dinámico a la muestra procedente de la misma extracción industrial que en la técnica de purge and trap, como se ha indicado en su momento, para poder disponer de resultados comparables.

Se han escogido las mismas temperaturas para poder comparar los resultados con la mayor exactitud, también se han extraído cantidades similares de oleorresina de pimentón en cada carga. Asimismo, se ha utilizado nitrógeno como gas de arrastre, con un caudal entre 60 y 90 ml/min. Como adsorbente también se han utilizado los cartuchos de carbón activado ORBO-32 (large), con las características indicadas anteriormente.

La figura 10.1 presenta la disposición del sistema de extracción mediante headspace dinámico. Para mantener una agitación constante también se ha empleado un agitador magnético, que se ha mantenido a 700 rpm, proporcionando también el calor necesario para mantener la temperatura en los puntos deseados en cada estudio. El recipiente se ha sumergido en un vaso que contenía una disolución de glicerina en agua.

El control de temperatura ha sido constante, y para el control del caudal se ha empleado un medidor de burbuja. El tubo portador de nitrógeno es de nylon y se ha dejado, durante la extracción, unos centímetros por encima de la superficie de la oleorresina de pimentón. Al igual que en el caso de purge and trap, se ha evitado que el compartimento B del cartucho detectase presencia excesiva de VOCs, por las razones ya conocidas.

La duración de la operación se ha tomado superior al mínimo, lo que permite asegurar un arrastre completo de los VOCs (en las condiciones de trabajo). Para conocer este tiempo mínimo se ha realizado pruebas previas. El comportamiento físico de la oleorresina ya se ha indicado en el capítulo correspondiente al purge and trap, y dándose la circunstancia de que se trata de las mismas temperaturas, se omite para no ser reiterativo.

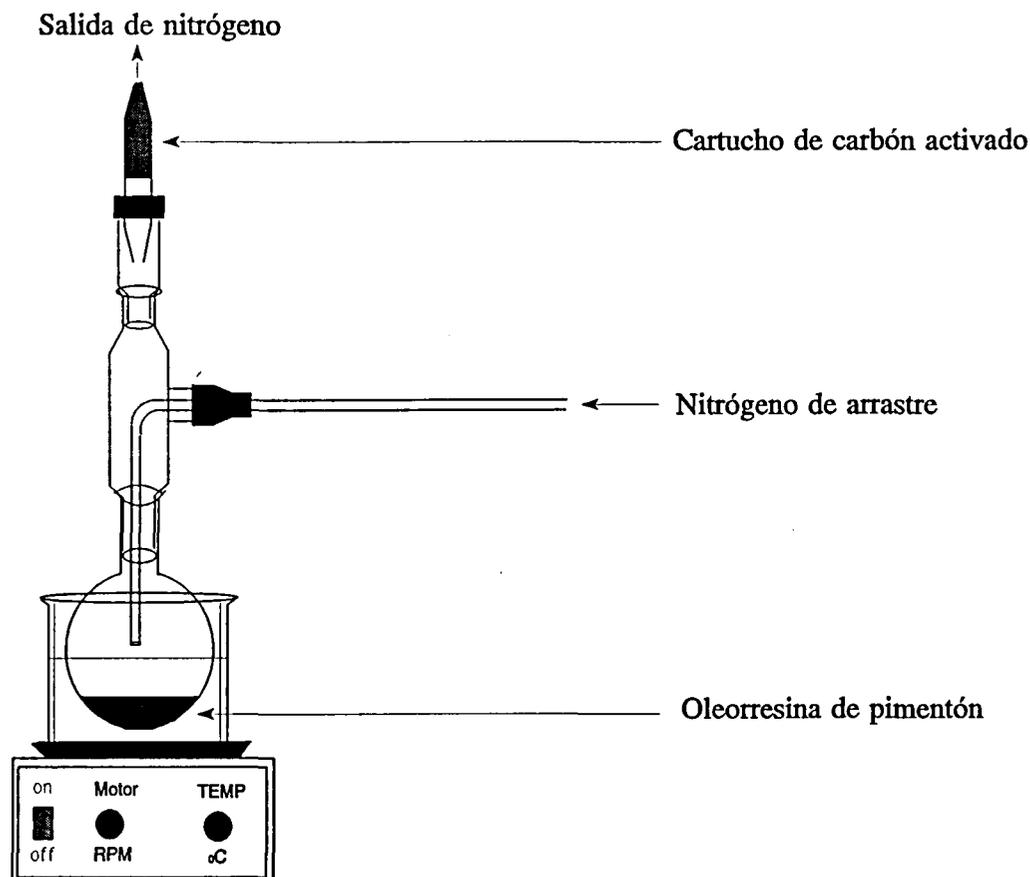


Figura 10.1 Sistema de extracción para la técnica de headspace dinámico.

La tabla que sigue a continuación indica las cargas, caudal de nitrógeno y tiempo de extracción para cada una de las experiencias que se han llevado a cabo a distintas temperaturas:

Tabla 10.1

Temperatura	Carga	Caudal de N <sub>2</sub>	Tiempo
30°C	30,2 g	60-90 ml/min	12 horas
50°C	33,3 g	60-90 ml/min	12 horas
81°C	31,4 g	60-90 ml/min	12 horas

Para seguir manteniendo los resultados comparables, la desorción se ha realizado hasta completar un volumen total de 1,6 ml de sulfuro de carbono.

## 10.2 Análisis cromatográfico de la extracción mediante la técnica de headspace dinámico

Obviamente se han realizado las mismas condiciones cromatográficas que permitan una comparación simple de los resultados de las diferentes técnicas utilizadas. Las condiciones han sido:

- Columna: DB-1 (J & W), 30 m x 0,251 mm, espesor fase estacionaria: 0,25  $\mu\text{m}$ .
- Programa de temperaturas:  
35° (isoterma durante 6 minutos) hasta 250° (3°/min), isoterma a 250° (2 minutos).
- Inyección: 3  $\mu\text{L}$ .
- Split: 16:1.
- Gas portador: helio a 1 ml/min (75 kpa), 14 cm/s.
- Temperatura inyector: 250°C.
- Temperatura detector: 275°C
- Detector: FID.

Los resultados obtenidos se muestran en los cromatogramas de las figuras 10.2, 10.3 y 10.4.

De las figuras indicadas anteriormente se observa la evolución de la extracción de VOCs de la oleoresina de pimentón mediante la técnica de headspace dinámico, que decididamente presenta mayor rendimiento a medida que aumenta la temperatura, como era de esperar. En principio se puede indicar la aparición de un mayor número de picos y del aumento cuantitativo de la mayoría de ellos. A pesar de ello, todavía no se puede considerar en términos absolutos, puesto que no se conoce la naturaleza de los mismos (lo que no permite conocer la influencia de la temperatura en la formación de VOCs derivados del aporte de calor).

En la experiencia realizada a 30°C se observa una presencia muy disminuida de VOCs, y todos ellos con tiempos de retención muy bajos, lo que no ofrece resultados positivos debido a tan baja diversidad de VOCs.

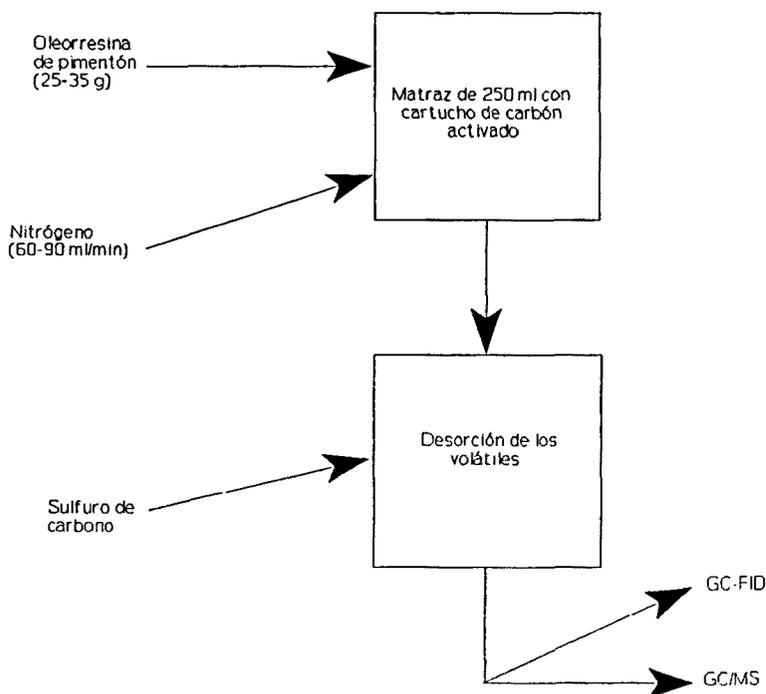
En la experiencia efectuada a 50°C la presencia cualitativa de VOCs ha aumentado considerablemente, lo que hace pensar en una influencia positiva de la temperatura en la extracción. Aparecen compuestos que presentan tiempos de retención más elevados que en el caso anterior, llegando hasta los 45 minutos aproximadamente.

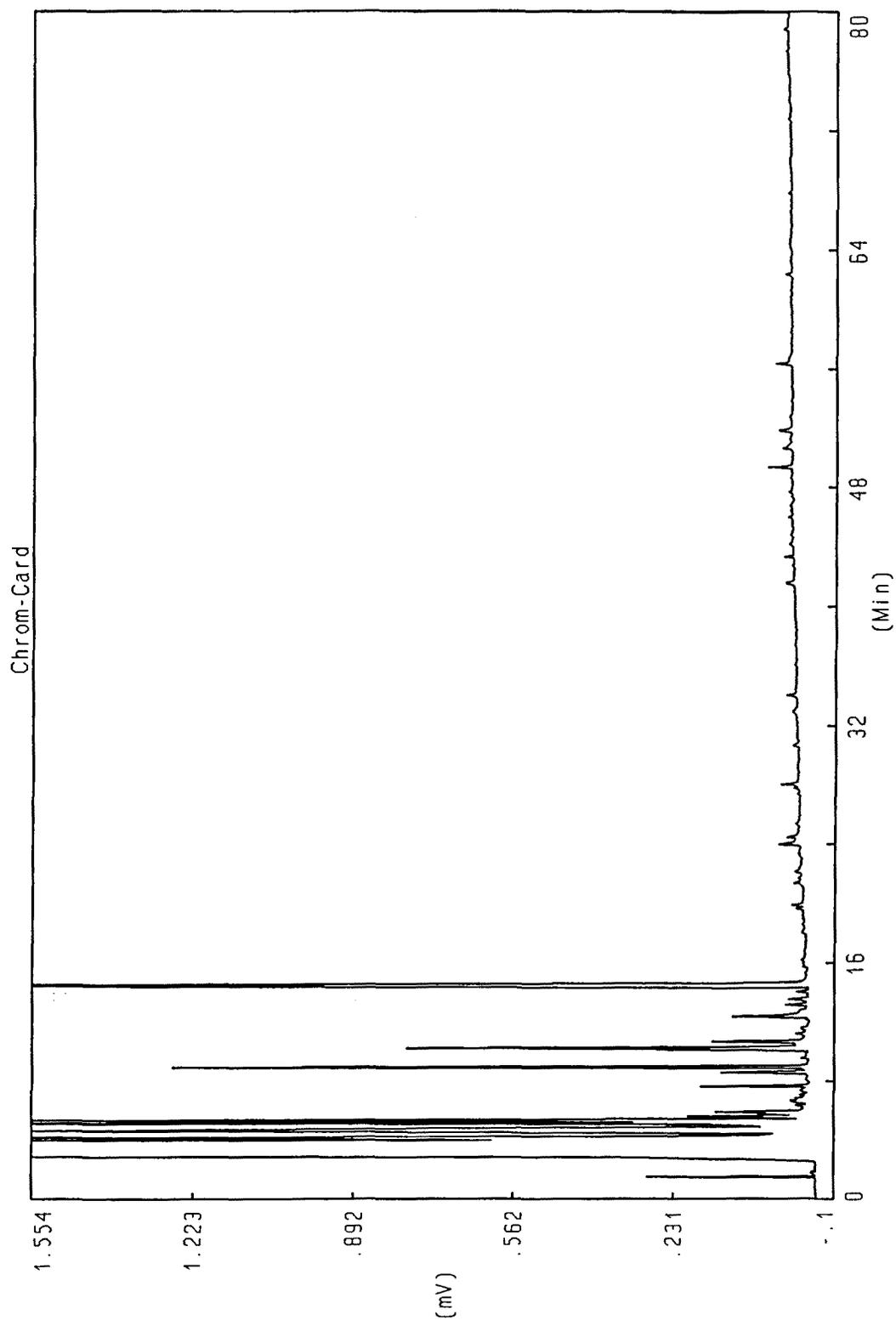
En la extracción realizada a 81°C, el aumento de VOCs, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo es apreciable, aunque, como en el caso anterior, dejan de aparecer a partir de los 50 minutos, aproximadamente, lo que hace pensar en un aumento del rendimiento cuantitativo, pero una estabilización en el aspecto cualitativo, a pesar de la aparición de algunos nuevos picos.

Para facilitar la observación de la evolución de los VOCs, se ha efectuado una superposición de los tres cromatogramas anteriores, que permiten comparar con mayor exactitud los resultados obtenidos, lo que se puede observar en la figura 10.5.

En este gráfico se ha representado del minuto 19,31 hasta el minuto 80 del análisis cromatográfico para observar mejor la evolución de los compuestos volátiles. Se observa claramente que la extracción a 50°C presenta ventajas muy positivas respecto a la extracción efectuada a 30 °C, aunque se ve superada por la extracción a 81°C, en la que, como se ha indicado previamente, la aparición de picos mayores y de nuevos picos es considerable.

El procedimiento de trabajo seguido para llevar a cabo el headspace dinámico es el siguiente:





Sample : HSDIN30S420  
Analysed : 14-02-94 19:50:15

Filename : HSDIN30.DAT  
Printed : 02-15-1994 13:11:45

Figura 10.2 Cromatograma de los VOCs obtenidos por headspace dinámico a 30°C.

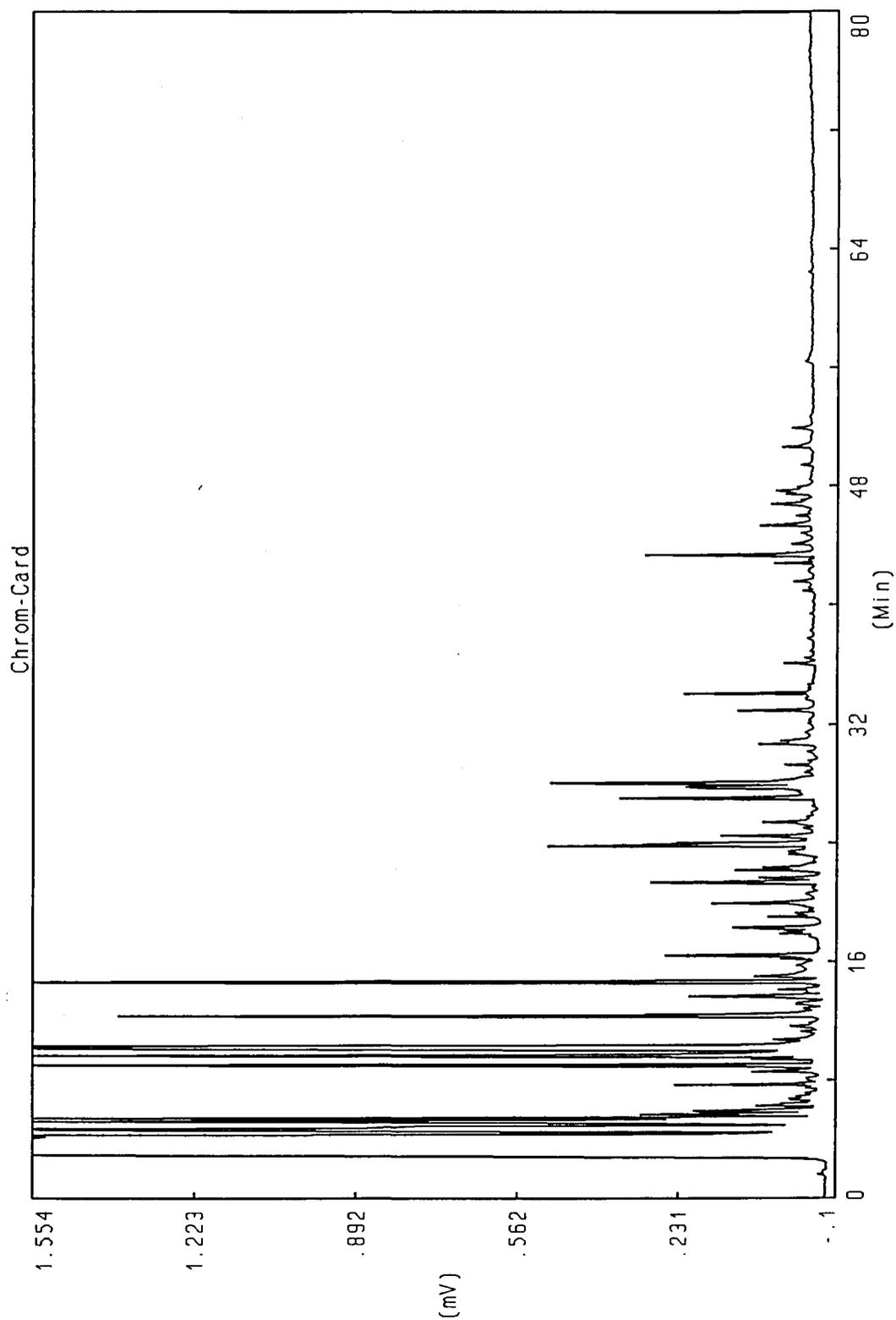
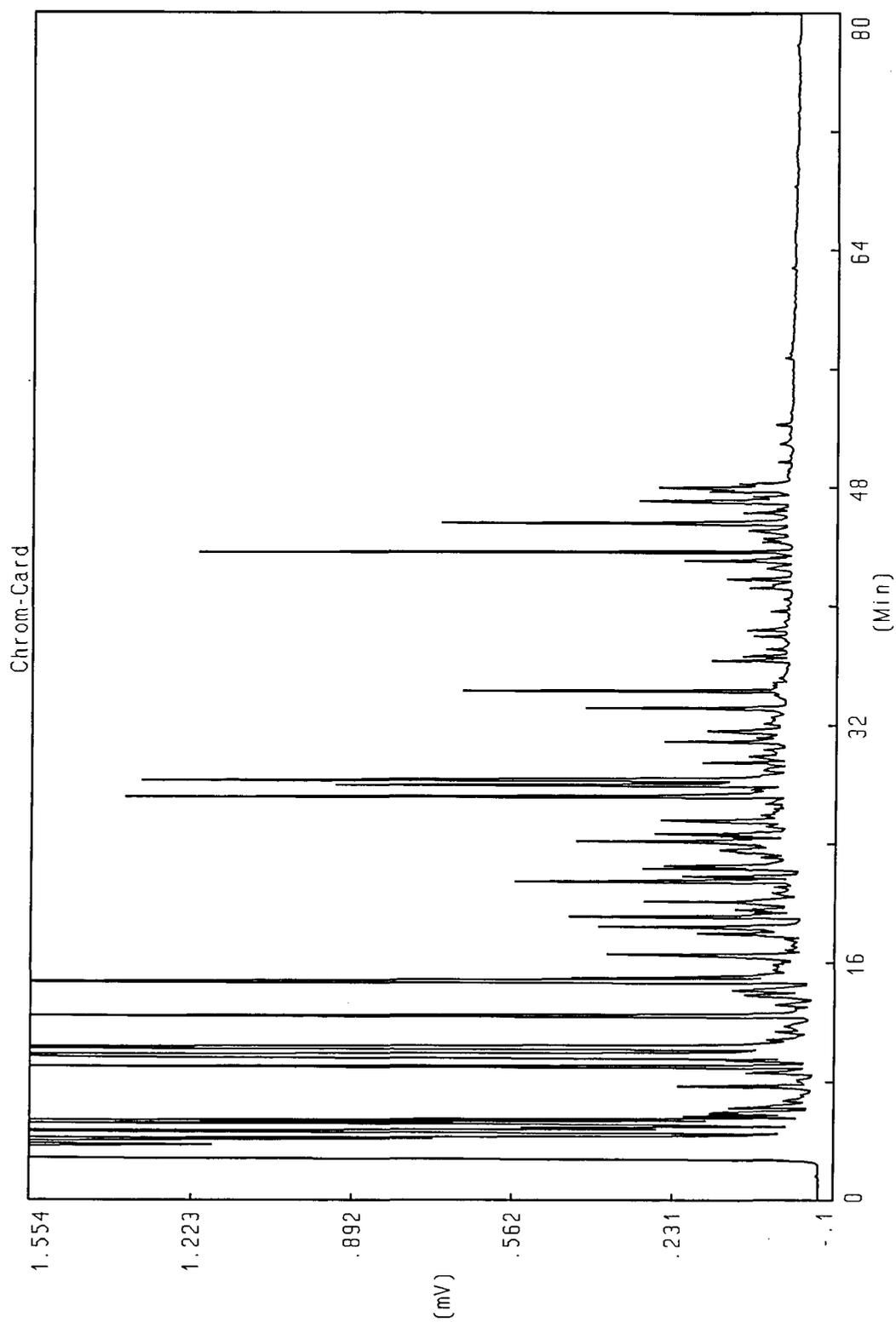


Figura 10.3 Cromatograma de los VOCs obtenidos por headspace dinámico a 50°C.



Sample : HSDIN81S420  
Analysed : 15-02-94 10:16:31

Filename : HSDIN81.DAT  
Printed : 02-15-1994 13:15:14

Figura 10.4 Cromatograma de los VOCs obtenidos por headspace dinámico a 81°C.

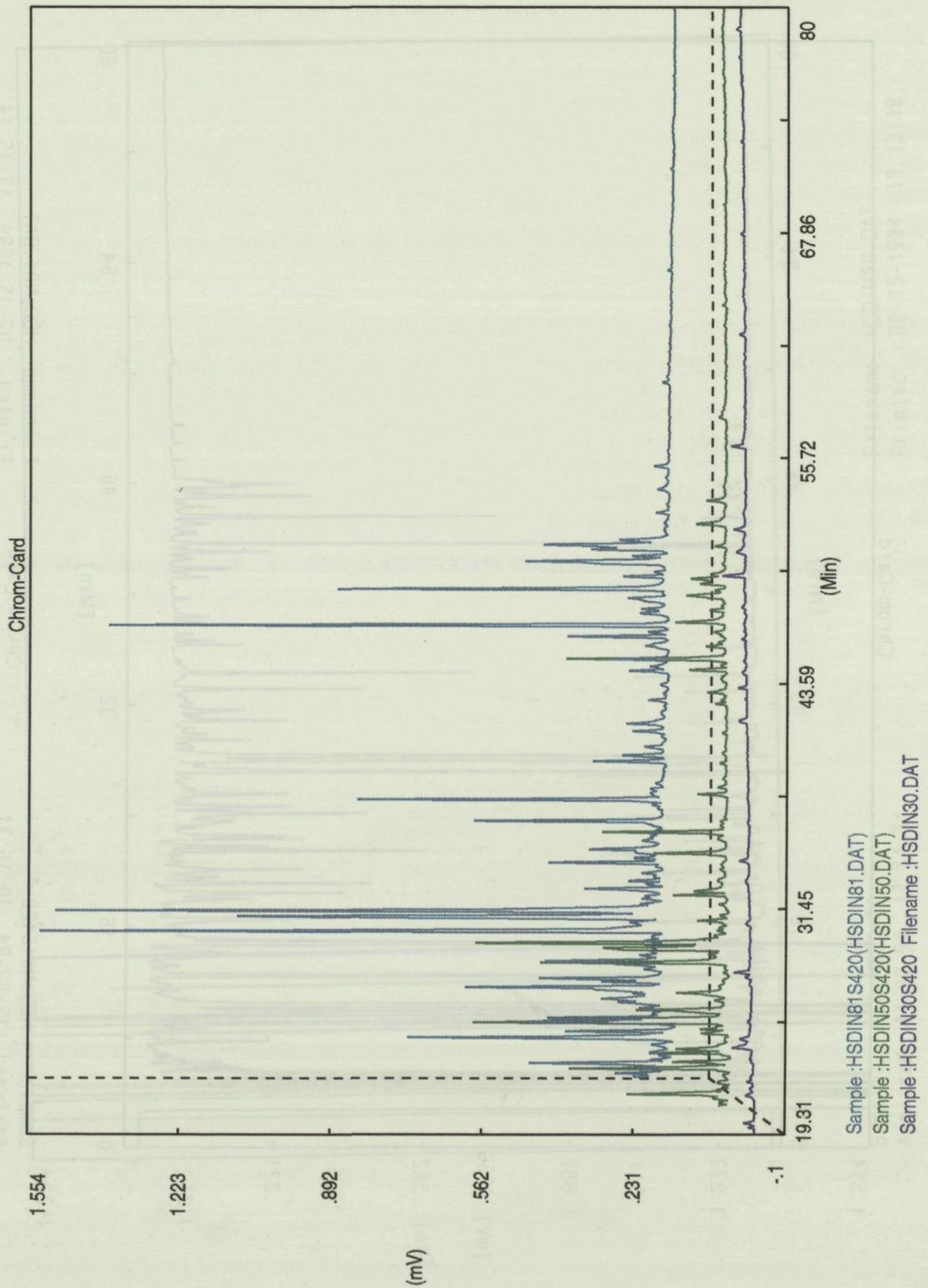


Figura 10.5 Comparación de los resultados obtenidos con las tres temperaturas de extracción.

## **CAPÍTULO 11**

# **SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE LA OLEORRESINA DE PIMENTÓN**

---

### **11.1 Condiciones cromatográficas utilizadas para la separación de los VOCs de la oleorresina de pimentón**

Aunque se ha considerado oportuno indicar en cada cromatograma las condiciones en las que se ha obtenido el mismo, en este apartado se intenta justificar, de forma generalizada, dichas condiciones.

Se ha indicado en diversas ocasiones que el seguimiento correcto de una extracción consiste en someter al extracto a una separación mediante cromatografía de gases. Ello permite ver los picos que aparecen y el aumento que sufren los que ya habían aparecido previamente, con lo que se accede al conocimiento de la duración de una extracción y su evolución en el tiempo.

Para conseguir las condiciones cromatográficas adecuadas se han probado diversas variaciones, aunque algunos parámetros se han ajustado con relativa facilidad, puesto que la bibliografía específica en análisis de volátiles indica valores de isotermas y rampas de temperatura que se mueven dentro de unos valores relativamente parecidos entre sí.

En el caso de las muestras con los volátiles de la oleorresina de pimentón se ha visto que mantener una rampa de 3°C/min es suficiente para conseguir la separación de los volátiles, y ha sido este valor el que se ha empleado de forma mayoritaria. Se ha comenzado los análisis entre los 35 y los 40°C, optando de manera más generalizada por el primer valor. Se ha observado que a partir de unos 230°C de la columna ya no aparecían volátiles en ningún cromatograma, lo que acota las temperatura máxima, que se ha fijado en 250°C, manteniéndose dicha isoterma durante unos minutos, para finalizar el cromatograma. Es

conveniente indicar que se ha trabajado en condiciones distintas a las indicadas, obteniéndose una resolución de los picos muy inferior cuando se ha tenido por objetivo realizar unos análisis cromatográficos de menor duración. También una utilización de condiciones más generosas no ha reportado una mejoría que las justificase.

La presencia de un disolvente dentro del cual se encuentran los volátiles aconseja realizar una isoterma durante un corto período de tiempo para permitir que aparezca el mencionado disolvente, así se consigue que enmascare a un menor número de volátiles, aunque esta situación se puede obviar en el único análisis que no se lleva a cabo con los volátiles contenidos en el seno de un disolvente: el headspace estático. Todo ello ha llevado a una duración máxima del análisis cromatográfico de 80 minutos, excesivo para alguno de los análisis; pero que, al mantenerse constante, ha permitido la comparación de diferentes técnicas de extracción, como se verá posteriormente.

El gas portador, siempre helio, se ha utilizado a una velocidad de flujo de 1-2 ml/min, aunque la influencia de su velocidad no sea decisiva si se tiene en cuenta la gráfica de van Deemter, puesto que en el caso de columnas capilares no se observa mucha disminución de la altura equivalente a un plato teórico al disminuir la velocidad del gas portador.

La introducción de la muestra en el sistema cromatográfico se ha llevado a cabo mediante la técnica split, variable según la concentración de volátiles en el disolvente para conseguir unos cromatogramas de presentación más homogénea, el volumen normal de inyección ha sido de 1 a 3  $\mu$ l. La relación de split (volumen que va al exterior respecto al volumen que se inyecta en la columna) ha variado desde 5:1 hasta 18:1.

La inyección se ha realizado a temperaturas entre 250 y 275°C, suficientes para asegurarse que se ha vaporizado toda la muestra. Por otra parte, el detector se ha mantenido en un intervalo de temperaturas similar.

El detector de ionización de llama (FID) es el más indicado para la determinación de componentes orgánicos de distinta naturaleza, y de entre los que conviene determinarlos a todos, sin considerar a unos más importantes que los demás. En este último caso se utilizaría otros tipos de detectores, más específicos para determinadas sustancias, se ha utilizado nitrógeno como make-up en todas las determinaciones en las que se ha empleado el FID.

El empleo de una columna no polar (DB-1) es aconsejable en el caso de desconocer aquellos componentes que se han extraído, y es recomendada en el análisis cromatográfico de aromas, aunque también se pueden utilizar columnas de otras polaridades. De hecho, así se ha efectuado para la separación cromatográfica previa a la identificación en los acoplamientos HRGC/MS, en los que se ha utilizado una columna DB-5, algo más polar. El amplio rango de temperaturas en el que se puede utilizar dicha columna (hasta 350°C), permite trabajar con mayor desahogo en los análisis de tanteo que se realizan en las primeras extracciones y en los que se desconoce la naturaleza de los componentes volátiles, y, por ello, su tiempo

de retención y su temperatura para abandonar la columna.

## 11.2 Identificación de los compuestos orgánicos volátiles. Condiciones de operación.

Los equipos básicos que se han utilizado para realizar el acoplamiento HRGC/MS se encuentran disponibles en el Laboratori d'Espectrometria de Masses del CID-CSIC de Barcelona. Se han utilizado dos equipos, cuya diferencia fundamental es que uno consta de un espectrómetro de masas magnético y el otro utiliza un espectrómetro de masas cuadrupolar.

### HRGC//MS magnético:

- Espectrómetro de masas magnético VG TS-250, al que está acoplado un cromatógrafo de gases KONIK serie 3000.
- Columna DB-5, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,22  $\mu\text{m}$  film.
- Gas portador: helio.
- Presión en cabeza: 1,2 kg/cm<sup>2</sup>.
- Velocidad lineal: 33 cm/s a 110°C.
- Inyección: split.
- Volúmen de inyección: 1-3  $\mu\text{l}$ .
- Rampa: 5°C/min.
- Rango de masas: 45-450 amu a 1s/década.
- Resolución: 500.
- Modo de ionización: Impacto electrónico en modo de iones positivos (EI<sup>+</sup>) a 70 eV.
- Librería: NIST/NBS de 62235 espectros.

### HRGC/MS cuadrupolar:

- Equipo integrado por un espectrómetro de masas Fisons MD800 y un cromatógrafo de gases CE serie 8000.
- Columna DB-5, 30 m, 0,25 mm I.D., 0,22  $\mu\text{m}$  film.
- Gas portador: helio.
- Presión en cabeza: 100 kPa.
- Velocidad lineal: 38 cm/s a 60°C.
- Inyección: split.
- Volúmen de inyección: 1-3  $\mu\text{l}$ .
- Rampa: 5°C/min.
- Rango de masas: 45-450 amu a 1s/década.
- Resolución: unitaria.
- Modo de ionización: Impacto electrónico en modo de iones positivos (EI<sup>+</sup>) a

70 eV.

- Ordenador: MI con un i486 DX2 a 50 MHz con software de tratamiento de datos LAB-BASE release 2.11.
- Librería: NIST/NBS de 53993 espectros.

Además, se ha utilizado la información disponible en un banco de datos de espectros de masas, que cuenta con una librería NIST de 62235 espectros de masas, instalada en un ordenador DIGITAL: VAX STATION 3100, gestionada por el programa OPUS de FISIONS INSTRUMENTS/VG Analytical.

### 11.3 Cuantificación de los compuestos orgánicos volátiles

La no disponibilidad de patrones de los VOCs identificados en la oleorresina de pimentón ha recomendado su cuantificación por medio de la adición de un patrón interno a la muestra, en cantidad aproximada a la de los demás VOCs identificados. El mencionado compuesto debe cumplir, además, con el requisito fundamental de no interferir con cualquier otro de los VOCs ya existentes, asimismo debe presentar un espectro de masas específico.

Después de diversas pruebas con varios compuestos, se ha optado por utilizar nerol [(Z)-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol], producto, además, de características afines a los VOCs identificados en la oleorresina de pimentón. Su espectro de masas se muestra en la figura 11.1.

A continuación se han llevado a cabo diversos ensayos para obtener el tiempo de retención en las condiciones de trabajo cromatográficas habituales para la separación de los VOCs, y se ha procedido a preparar la disolución de nerol.

Si bien en el sistema HRGC/MS se han mantenido las condiciones habituales, se ha inyectado la muestra en modo splitless. Se ha escogido este modo de inyección ya que se trata de un análisis cuantitativo y diversos autores sostienen que una determinación cuantitativa utilizando el método split puede inducir a error debido a la posibilidad de una pérdida de los componentes más volátiles, ya que al producirse la división existe una tendencia de los mencionados compuestos a ocupar mayoritariamente la vía que lleva el gas portador a la atmósfera, aunque debe considerarse la poca presencia de compuestos altamente volátiles en la oleorresina de pimentón. El volumen de inyección ha sido de 1  $\mu$ l. La rampa utilizada ha sido de 4°C/min.

Para la interpretación de los resultados, se ha realizado la simplificación (aceptada en muchos estudios similares) de que todos los compuestos orgánicos volátiles presentan la misma respuesta en el sistema de detección (factor de respuesta unidad), lo que permite realizar una evaluación de las cantidades aproximadas que contiene la muestra, por simple relación entre áreas.

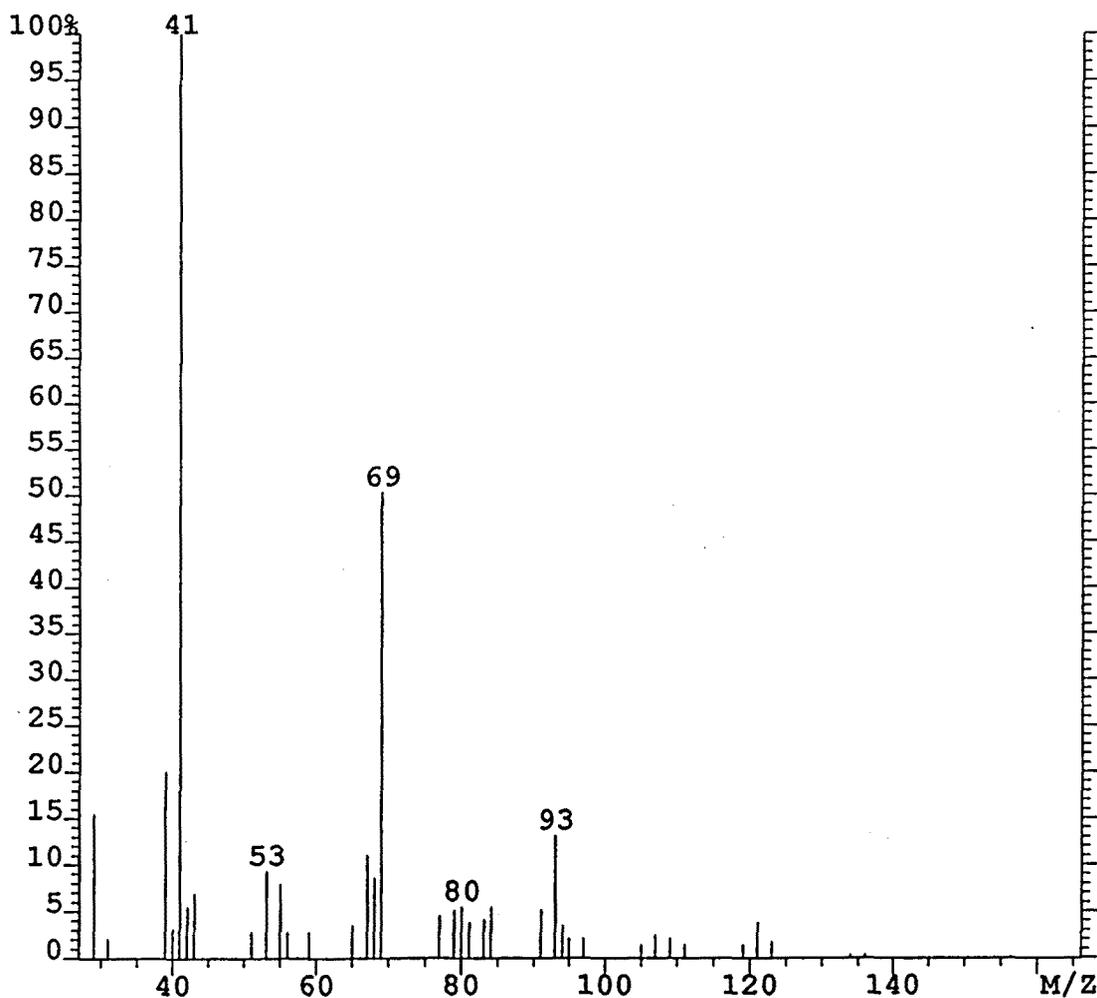


Figura 11.1 Espectro de masas del nerol.

En primer lugar, se calcula el contenido en nerol del volúmen que se ha inyectado, pudiendo extrapolarse hasta el volúmen total del extracto, y como se conoce la masa total de oleorresina de la que se ha obtenido el extracto, se puede cuantificar de manera aproximada. Para conseguir una respuesta parecida a la de los VOCs ya existentes, se ha llegado a la conclusión de preparar una disolución de nerol al 1 por 1000 en hexano (disolvente utilizado en la mayor parte de extracciones).

Se han tomado 100  $\mu\text{l}$  de extracto de la muestra LN S-420, a los que se han añadido 20  $\mu\text{l}$  de disolución al 1 por 1000 de nerol. La elección de un extracto obtenido mediante el método de Likens y Nickerson está justificada en otro apartado por ser el método que produce mejores resultados en la obtención de los VOCs. La figura 11.2 presenta el cromatograma del extracto con el nerol que se ha adicionado y a partir del cual se han realizado los cálculos cuantitativos. La cuantificación de VOCs se ha llevado a cabo, únicamente, para aquellos considerados mayoritarios.

LABORATORI D'ESPECTROMETRIA DE MASSES  
 LNS-420 (169) + Nerol  
 MD-800/EI+ CID-CSIC

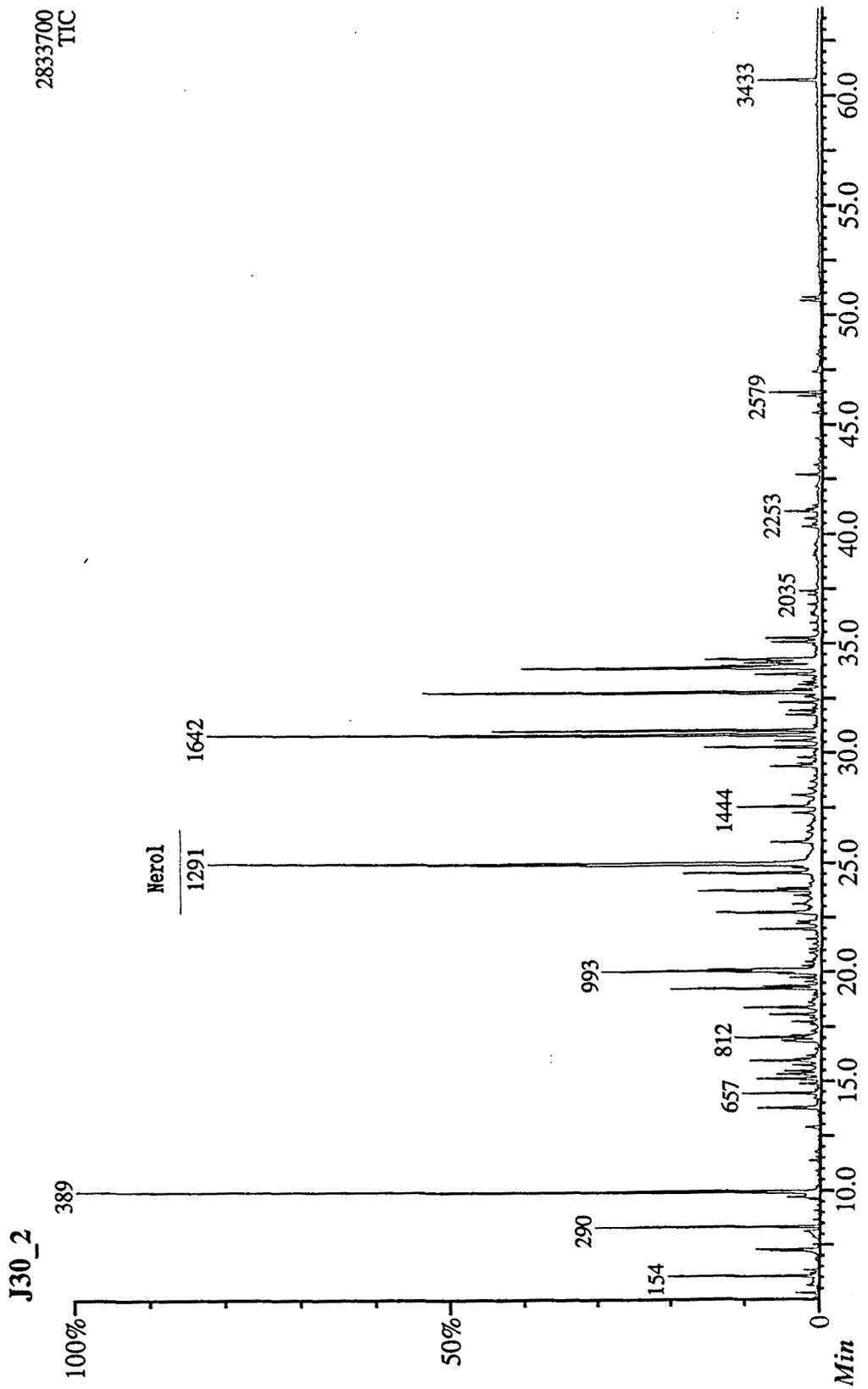


Figura 11.2

Cromatograma para la valoración cuantitativa de los VOCs identificados en la oleoresina de pimentón.