

Del 7 al 10 de mayo de 2019

**CENTRO UNIVERSITARIO
SANTA ANA
ALMENDRALEJO**



**XLI JORNADAS
DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA
TIERRA DE BARROS**

I Congreso Agroalimentario de Extremadura

**XLI Jornadas
de VITICULTURA Y ENOLOGÍA
de la Tierra de Barros
I Congreso Agroalimentario de Extremadura**

Edita:

Centro Universitario Santa Ana
C/ IX Marqués de la Encomienda, nº 2
Almendralejo
Tel. 924 661 689
<http://www.univsantana.com>

Ilustración de portada:

© Vito Cano.
Detalle del mural del mercado de abastos "Las mercedes"
Almendralejo (Badajoz)

Diseño original:

Tecnigraf S.A.

Maquetación: Virginia Pedrero

ISBN: 84-7930-109-0

D.L.:

Imprime: Impresal

Efectos del cultivo de puerro en su composición volátil: derivados organosulfurados

NIETO-SIERRA, L. ¹

CARRERA, C. ¹

MONTIEL, C. ¹

VELA, M.D. ²

ACOSTA, V. ²

PALMA, M. ¹

1 .Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Instituto de Investigación Vitivinícola y Agroalimentaria (IVAGRO), Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3), Campus Río San Pedro, 11510, Puerto Real, Cádiz.

2. Centro IFAPA Rancho de la Merced, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Junta de Andalucía. Camino de Esparragosa s/n 11550 - Chipiona, Cádiz.

RESUMEN

En este trabajo se aborda la identificación de los principales compuestos volátiles responsables del aroma de los puerros mediante un sistema TD-GC-MS, es decir, no se realiza sobre extractos de puerros, sino directamente sobre muestras sólidas que serán sometidas al sistema TD (Thermal Desorption). Esta aproximación facilita el tratamiento de las muestras, porque lo reduce al mínimo, pero dificulta la separación, puesto que no hay una separación previa de los volátiles de la matriz. No hay

descrito en la bibliografía consultada un método similar, ya que habitualmente se realiza la determinación sobre extractos producidos previamente al análisis cromatográfico. El método se aplica sobre una serie de muestras producidas en dos condiciones de cultivo diferentes, cultivo tradicional y cultivo sostenible, con el fin de determinar si la técnica de cultivo afecta a la producción de compuestos volátiles en las plantas de puerros.

Palabras clave: puerro, cromatografía de gases, desorción térmica, espectrometría de masas.

ABSTRACT

The aim of this research project is identifying the main volatile compounds responsible for the aroma of leeks through a TD-GC-MS system. This method will not be done on leek extracts, but it will be done directly on solid samples that will be analyzed in TD system (Thermal Desorption). This approach facilitates the treatment of the samples, since it is reduced to a minimum, but it makes separation more difficult due to the fact that there is no previous separation of the volatiles from the matrix. There is no bibliography about any similar method. The method is applied on a series of samples produced under different growing conditions such as traditional cultivation and sustainable cultivation, in order to determine whether the cultivation technique has any effect in volatile compounds production in leek plants.

Key words: leek, gas chromatography, thermal desorption, mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN

Los puerros pertenecen a las plantas del género *Allium*, las cuales se encuentran presentes en la dieta mediterránea, ya que se han utilizado desde la antigüedad como condimentos gastronómicos.

Además del puerro (*Allium ampeloprasum* var. *Porrum*), el género *Allium* presenta un gran número de variedades, incluyendo más de 600 especies diferentes, entre las que destacan el ajo (*Allium sativum*), la cebolla (*Allium cepa*) o la cebolleta (*Allium schoenoprasum*) debido a que han sido las más utilizadas en la gastronomía así como las más estudiadas.¹

De entre éstas, los puerros representan un cultivo de alto valor y futuro en la zona sur de España. En unos casos, por ser una especie cultivada actualmente y con una cuota de mercado importante y, en otros casos, por ser una alternativa que se está introduciendo dentro de las pequeñas y medias explotaciones agrícolas.

Además, ciertos estudios demuestran una relación entre el consumo de ciertas especies de este género y beneficios para la salud como una disminución del riesgo de cáncer de mama, así como de problemas cardiovasculares gracias a sus efectos antitrombóticos, antihipertensivos, hipolipemiantes, hipocolesterolémicos y anti-hiperhomocisteínicos.²

Así mismo, pueden presentar también propiedades antimicrobianas, anti-diabéticas, antioxidantes, antiespasmódicas, antiasmáticas, antiinflamatorias y neuroprotectoras entre otras muchas.³

Este tipo de características se deben a la presencia de compuestos bioactivos, concretamente compuestos organosulfurados y polifenoles, los cuales también se encuentran presentes en otras plantas.⁴

Cuando se rompe el tejido de los puerros como resultado de la masticación, cocción o extracción de los mismos, ocurre la hidrólisis enzimática de los ACSOs (alk(en)yl cysteine sulfoxides). La mayoría de los compuestos aromáticos se generan mediante reacciones espontáneas debido a los ácidos sulfénicos, entre ellos mismos y otros compuestos. Como resultado se obtienen una serie de compuestos que contienen azufre, entre los que se incluyen mono-, di- y trisulfuros.⁵

Los métodos que se aplican actualmente en la determinación de los compuestos citados se centran en extracciones sólido-líquido con el apoyo de técnicas como los ultrasonidos o HPLC aunque la mayor parte de los trabajos se han realizado sobre ajos, no sobre puerros.⁶

Este tipo de extracciones suele conllevar la utilización de disolventes orgánicos como metanol o una mezcla de metanol y agua o metanol y cloroformo.

En este trabajo se propone la utilización de una nueva familia de técnicas más ecológicas y respetuosas con el medio ambiente. Estas técnicas presentan estas características ya que permiten un muestreo sin preparación o separación previa, por lo que no requieren la utilización de ningún tipo de disolvente o un gasto energético extra.⁷

Además, esta ventaja no supone únicamente el ahorro desde el punto de vista ecológico, sino que también conlleva una disminución del tiempo empleado en el análisis.

En concreto se utiliza un sistema de cromatografía de gases y desorción térmica junto a un espectrómetro de masas (GC-TD-MS). Además, el análisis mediante cromatografía de gases presenta ventajas en cuanto a la alta resolución y a la facilidad en la identificación de compuestos gracias a la utilización del MS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Condiciones de cultivo de puerros

Se realizaron ensayos en invernadero, con 3 repeticiones por variedad y tipo de cultivo, en bloques aleatorios. Se realizó una comparativa entre cultivo convencional y cultivo sostenible de 500 m² cada uno. Se utilizaron dos variedades: Duratón (Nunhems Spain S.A. El Ejido, España) y Gigante de Bulgaria “Vela” (Semillas Ramiro Arendo, Sevilla, España).

El cultivo tradicional tuvo el siguiente tipo de fertilización:

Floranid Permanent	(16-7-25) 500 Kg/ha (80UF N)
Fosfato Monoamónico	(12-60-0) 120 Kg/ha (14,4 UF N)
Nitrato Potásico	(13-0-46) 100 Kg/ha (13 UF N)
Urea	(46-0-0) 160 Kg/ha (73,6 UF N)

Lo que produce una cantidad de implica una cantidad de nitrógeno aportada de 181 UF N.

El cultivo sostenible se realizó aportando únicamente productos con certificación ecológica, concretamente:

Enmienda orgánica ecológica de procedencia vegetal con 90%MO:

Biogenasol (5,5-2,5-1,5) 800 Kg/ha (44 UF N)

Fósforo de alta asimilación con extractos húmicos (Ecológico):

Fosmax ECO complejo con fósforo y potasio asimilable (0-10-15)
40 L/ha (0 UF N)

Excalibur, extracto húmico 27% (23,5 Ac. Húm. + 3,5 Ac. Fúlv.):
35 L/ha (0 UF N)

Nutrichem ECO (nitrógeno orgánico+aminoácidos+extractos húmicos)
156 L/ha (9,5 UF N)

Complex AID 6% aminoácidos de fermentación enzimática (2-0-0)
38 L/ha (0,76 UF N)

Lo que produce una cantidad de implica una cantidad de nitrógeno aportada de 54,26 UF N.

Muestras de puerros

En cuanto al tratamiento de la muestra, cabe citar que se disponía de diez plantas de puerros por cada variedad y bloque de cultivo. Para cada una de ellas se eliminaba medio centímetro desde la raíz, para evitar introducir partes de la misma. Por otro lado, para facilitar la homogeneización se trituran todas las muestras de cada variedad mediante la utilización de una batidora convencional, durante 10 minutos evitando calentamiento de la muestra.

Análisis de los compuestos volátiles de las muestras de puerros

Los compuestos volátiles mayoritarios se han determinado mediante un sistema TD-GC-MS, directamente sobre la muestra sólida. El equipo de desorción incluye un sistema de desorción térmica (TD, Thermal Desorption), utilizando concretamente el modelo TD-20-230V Shimadzu (Kyoto, Japón).

Las muestras (aproximadamente 50 mg) se colocan en los tubos de desorción (dimensiones 6.35mm x 90mm), los cuales se introducen posteriormente en el sistema de desorción térmica, que calienta (150°C) los mismos haciendo pasar un flujo de helio (60 mL min⁻¹ durante 10 min), liberando de esta manera los compuestos volátiles. Posteriormente, éstos son arrastrados a trampas de focalización frías (-40 °C), donde se concentran de nuevo, tal y como se aprecia en la figura 1. Una vez finalizado este proceso, las trampas se calientan (250 °C) introduciendo los compuestos orgánicos volátiles directamente al sistema de GC-MS.

El cromatógrafo de gases utilizado es el modelo GC-2010 plus de Shimadzu (Kyoto, Japón) y está equipado con una columna BPX5 (30 m, 0.25 mm de diámetro, 0.25 μ m) de Trajan (Ringwood, Victoria, Australia), con una velocidad lineal de 35 cm s⁻¹ y un flujo de 1.91 mL min⁻¹.

Además, se trabaja en modo SIM, el cual es necesario para poder obtener una detección más precisa. El espectrómetro de masas realiza un barrido de 30-400 m/z, y gracias al mismo se facilita la identificación de los compuestos. La identificación se realiza con librería NIST 14 (Gainthersburg, EEUU).

Cada variedad se analiza por triplicado, para validar de esta manera que la muestra es suficientemente homogénea. Una vez obtenidos los resultados, se comprueba que las tres réplicas no presentan diferencias superiores al 20%. En caso contrario, se escogen los dos resultados más similares y se realiza el promedio de los mismos.

Análisis de los datos

Los datos resultantes de los análisis se recogen gracias a la utilización del software GCMS Solution Version 4.45. Se ha utilizado el programa Minitab 17 para la realización de los análisis de cluster y la presentación de los resultados en dendogramas necesarios para obtener las principales conclusiones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de los efectos de cultivo tradicional frente a sostenible se ha realizado empleando para ello una serie de componentes volátiles que contribuyen de forma directa al aroma de los puerros. Se trata de un conjunto de 17 compuestos organosulfurados que se detallan en la tabla 1.

El análisis de los resultados se ha realizado empleando los valores de concentración relativa en cada uno de los análisis. De esta forma se ha podido evaluar cómo varían las concentraciones relativas en función de las condiciones de cultivo para cada una de las dos variedades estudiadas. Los efectos se han evaluado tanto analizando el comportamiento de los 17 compuestos organosulfurados identificados como evaluando las similitudes entre las muestras en base a esos 17 compuestos organosulfurados.

Selección e identificación de los compuestos volátiles mayoritarios

En la bibliografía revisada se mencionan a los sulfóxidos y a sus derivados organosulfurados como los principales responsables de las propiedades aromáticas de los puerros.⁷ En las muestras analizadas se ha procedido a la identificación de los compuestos organosulfurados presentes, mediante comparación de los espectros de masas con la librería NIST 14. En la mayoría de las muestras se han identificado los compuestos presentados en la tabla 1. En dicha tabla se ha incluido la estructura química, el tiempo de retención en el cromatograma de gases y relaciones m/z seleccionadas para su identificación y cuantificación.

De los 17 compuestos estudiados, se ha encontrado que en la mayoría de las muestras, era el disulfuro de dipropilo el compuesto más abundante, tanto en las muestras correspondientes al cultivo tradicional como en las correspondientes al cultivo sostenible. Este compuesto ya ha sido descrito con anterioridad como el compuesto más abundante en puerros y en otras especies del género *Allium*.⁷ Además de éste, se han encontrado otros compuestos comunes entre el puerro y otras especies de este género, tales como el 3,4- dimetiltiofeno, metilpropildisulfuro, trisulfuro de dimetilo, 1-metil-2-propenildisulfuro, disulfuro de dipropilo y trisulfuro de dipropilo.

Análisis quimiométrico

Dado el alto número de datos obtenidos en los análisis por TD-GC-MS, se decidió utilizar técnicas quimiométricas para su tratamiento, con el objeto de maximizar el aprovechamiento de los mismos. Las técnicas utilizadas han sido de tipo no supervisado, concretamente el análisis de componentes principales (Principal Components Analysis: PCA) y el análisis de conglomerados o clusters (Cluster Analysis: CA). Estas dos herramientas permiten determinar el agrupamiento de las muestras y también de las variables estudiadas.

En primer lugar, se ha realizado un análisis conjunto de todas las muestras y empleando para ello todos los compuestos analizados. Se realizó un PCA en el que los dos primeros componentes, PC1 y PC2, recogieron el 46 y el 26% respectivamente de la varianza de las muestras. Las contribuciones a cada uno de estos factores de los compuestos usados se representan en la figura 2. Puede observarse como existe una contribución bastante homogénea para un gran número de compuestos en la parte positiva del PC1.

Tan solo los disulfuros de dimetilo, de metilpropilo y de dipropilo contribuyen en la parte negativa del PC1. El trisulfuro de dimetilo presenta una contribución neutra en el PC1, quedando todos los demás compuestos en la zona positiva del PC1. Esto se puede interpretar como que los efectos de las técnicas de cultivo se muestran homogéneos en la mayor parte de los compuestos analizados, presentando un comportamiento diferente los compuestos mencionados anteriormente. El PC2 tiene una contribución notablemente inferior sobre la varianza de las muestras y por tanto las contribuciones de los compuestos sobre el PC2 resultan menos significativas. Sin embargo puede observarse como la mayoría de los compuestos trisulfurados se recogen en valores negativos del PC2 y positivos del PC1, por lo que parece que también presentan un comportamiento diferenciado respecto al resto de compuestos organosulfurados.

Con el mismo conjunto de muestras se realizó un CA. El dendrograma resultante se recoge en la figura 3. Al igual que se ha comentado en el caso de las contribuciones de los compuestos sobre el PCA, se encontró que hay un grupo de 3 compuestos organosulfurados con comportamiento diferente, esto es, disulfuro de dimetilo, el metilpropildisulfuro y el disulfuro de dipropilo forman un cluster (cluster A) claramente diferenciado de los clusters formados por los demás compuestos analizados. Entre los restantes compuestos, hay que destacar el cluster C, formado por los compuestos con sustituyente metilo, tanto monometilados como dimetilados, independientemente de tipo de sulfuro (disulfuros, trisulfuros y tetrasulfuros). Es decir, las variaciones en las concentraciones de los compuestos mono y dimetilados son homogéneas entre las muestras y además diferente que las variaciones que muestran los compuestos con otro tipo de sustituyentes. Finalmente, el clúster B recoge a compuestos con sustituyentes mixtos y con distinto tipo de organosulfurado.

Se realizó también un CA de muestras, con el fin de determinar el tipo de agrupamiento que se produce para las muestras en base a los compuestos analizados. Se comenzó con las muestras bajo cultivo convencional frente a las de cultivo sostenible (Figura 4). En el dendrograma resultante puede verse una cierta tendencia a la agrupación según el tipo de cultivo, aunque hay similitudes importantes entre muestras de distinto tipo de cultivo. Así el clúster A engloba tanto a muestras de cultivo convencional y de cultivo sostenible. El subclúster A1 recoge mayoritariamente a muestras de cultivo convencional y el clúster A2 a una mezcla de ambas. En cambio, el clúster B

engloba mayoritariamente a muestras correspondiente al cultivo bajo condiciones sostenibles.

Como se ha comentado se habían incluido en el estudio dos variedades de puerro, ambas con interés comercial y ambas con una cuota de producción similar, se trataba de la variedad Gigante y de la variedad Duraton. Puesto que se tenían estas dos variedades, se realizó un CA para determinar si habría diferencias en su composición dependiendo de la variedad. El dendrograma de la figura 5 recoge los resultados. Puede observarse como el clúster A incluye muestras únicamente de la variedad Gigante, mientras que el clúster B reúne a la mayor parte de las muestras de la variedad Duraton. Finalmente, el clúster C incluye muestras de ambas variedades. Es decir, la composición a nivel de componentes organosulfurados en ambas variedades es diferente, si bien no permite una diferenciación perfecta de ambas variedades.

Para intentar explicar esta agrupación parcial de las muestras de las dos variedades, se realizaron CA parciales según la variedad y el tipo de cultivo. En las figuras 6 y 7 se muestran los dendogramas de la variedad Duraton y Gigante según el tipo de cultivo. En el caso de la variedad Gigante, puede observarse como las muestras correspondientes a diferente tipo de cultivo quedan separadas en el dendrograma, por lo que se puede concluir, que, en el caso de esta variedad, un cambio en las condiciones de cultivo se refleja el metabolismo asociado a los compuestos organosulfurados. En el caso de la variedad Duraton (figura 7), el dendrograma refleja en cambio, una falta de diferenciación según el tipo de cultivo. Por ello, los niveles de los compuestos organosulfurados no reflejan el cambio de las condiciones de cultivo.

Dado que en el caso de la variedad Gigante sí se han registrado efectos debido a las condiciones de cultivo, se realizó un CA sobre los compuestos empleando únicamente estas muestras, con la intención de determinar sobre qué compuestos se producían los cambios debido a las condiciones de cultivo. Los resultados del CA se presentan en el dendrograma en la figura 8, en la que puede observarse como se producen dos clústers claramente diferentes. Por un lado el clúster B, homogéneo y que reúne a la mayor parte de los compuestos organosulfurados analizados, incluyendo derivados tri y tetrasulfurados y sólo dos disulfurados y el clúster A, heterogéneo y que incluye a la mayoría (4 de 6) de los compuestos disulfurados. Se puede concluir por tanto, que los compuestos que se modifican al cambiar el tipo de

cultivo en la variedad Gigante son el disulfuro de dimetilo, el disulfuro de metilpropilo, el disulfuro de dipropilo y el disulfuro de 1-alil-2-isopropilo.

CONCLUSIONES

Los compuestos organosulfurados se ven afectados por las condiciones de cultivo (convencional vs sostenible) en la variedad Gigante pero no en la variedad Duraton. Esto implica que se producen cambios en las plantas de puerro según el tipo de cultivo, si bien estos cambios no resultan significativos en todas las variedades. Esta respuesta ante las condiciones de cultivo que es modulada por la variedad de puerro, va a dificultar o incluso impedir, utilizar estos componentes como herramienta para caracterizar el tipo de cultivo o la variedad de puerro.

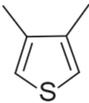
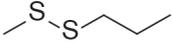
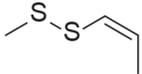
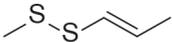
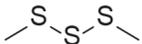
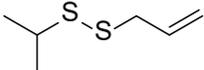
AGRADECIMIENTOS

Este estudio se ha desarrollado dentro del proyecto TRANSFORMA "Horticultura al Aire Libre" TRA201600.17" financiado a través de fondos FEDER.

BIBLIOGRAFÍA

1. POOJARY, M.M. *et al.*, (2017). "Stability and extraction of bioactive sulfur compounds from *Allium* genus processed by traditional and innovative technologies". *J. Food Compos. Anal.* 61, 28–39.
2. PUTNIK, P., *et al.*, (2019). "An overview of organosulfur compounds from *Allium* spp.: From processing and preservation to evaluation of their bioavailability, antimicrobial, and anti-inflammatory properties". *Food Chem.* 276, 680–691.
3. S. BISEN, P.; EMERALD, M. (2016). Nutritional and Therapeutic Potential of Garlic and Onion (*Allium* sp.)". *Curr. Nutr. Food Sci.* 12, 190–199.
4. ROSELLÓ-SOTO, E. *et al.*, (2018). "Enhancing Bioactive Antioxidants' Extraction from "Horchata de Chufa" By-Products". *Foods* 7, 161.
5. COLINA-COCA, C.; GONZÁLEZ-PEÑA, D.; VEGA, E.; DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C. (2013). "Novel approach for the determination of volatile compounds in processed onion by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS GC-MS)". *Talanta* 103, 137–144.
6. MONDY, N.; NAUDIN, A.; CHRISTIDES, J.P.; MANDON, N.; AUGER, J. (2006). "Comparison of GC-MS and HPLC for the analysis of *Allium* volatiles". *Chromatographia* 53, S356–S360.
7. RAMIREZ, D. A.; LOCATELLI, D. A.; GONZÁLEZ, R.E.; CAVAGNARO, P.F.; CAMARGO, A.B. (2017). "Analytical methods for bioactive sulfur compounds in *Allium*: An integrated review and future directions". *J. Food Compos. Anal.* 61, 4–19.
8. PETROPOULOS, S.A. *et al.*, (2018). "Nutritional value, chemical characterization and bulb morphology of Greek Garlic landraces". *Molecules* 23, 1–14.

Tabla 1. Sulfuros encontrados en las muestras de puerros. *En negrita el ion m/z usado para cuantificar.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN	M/Z*	ESTRUCTURA
Sulfuro de dimetilo	2.31	60,47	
Disulfuro de dimetilo	5.01	94,79,61	
3,4-dimetiltiofeno	8.863	111,97,77	
Metilpropildisulfuro	9.453	122,80,79,64	
(Z/E) -1-metil-2-propenildisulfuro	9.534-9.711	120	
			
Trisulfuro de dimetilo	10.338	126,111,79,64	
Disulfuro de dipropilo	12.292	150, 108,43	
1-alil-2-isopropildisulfuro	12.397	148,106,73	

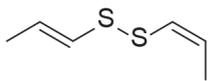
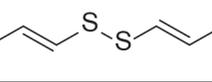
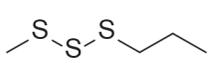
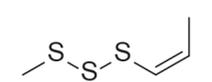
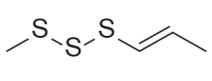
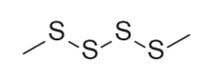
(Z/E)- dipropenildisulfuro	12.468-12.516	146,73,45	
			
Metilpropiltrisulfuro	12.909	154,112,79,64	
(Z/E)- metilpropeniltrisulfuro	13.005-13.061	152,45	
			
Tetrasulfuro de dimetilo	13.703	94,79,64	
(Z/E)-1,3- dipropeniltrisulfuro	14.846-14.905	114,59	
			

Figura 1. Desorción térmica (fuente: Shimadzu).

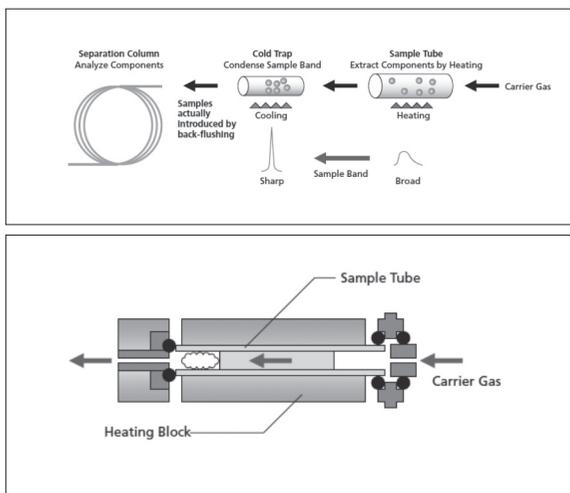


Figura 2. PCA de todos los componentes analizados.

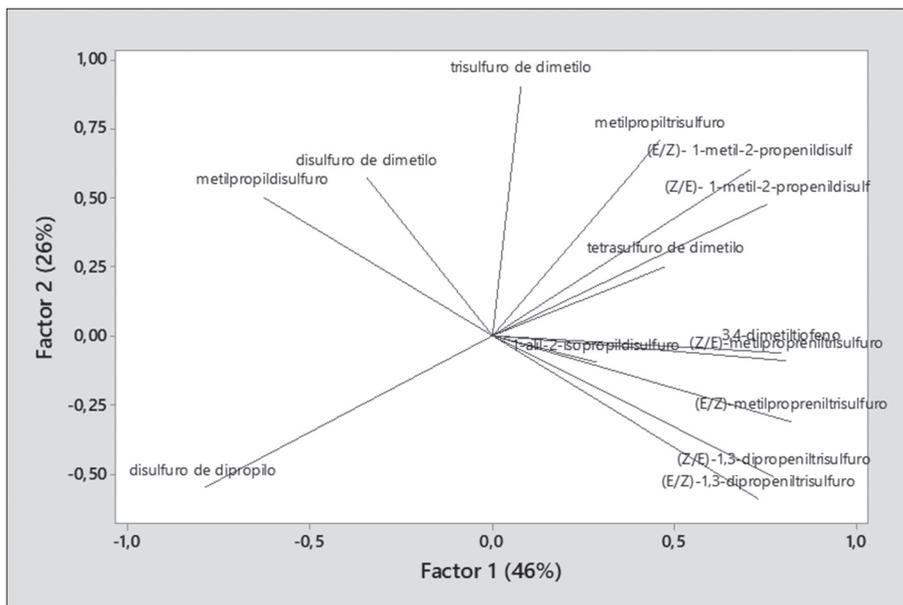


Figura 3. Dendrograma de todos los compuestos analizados.

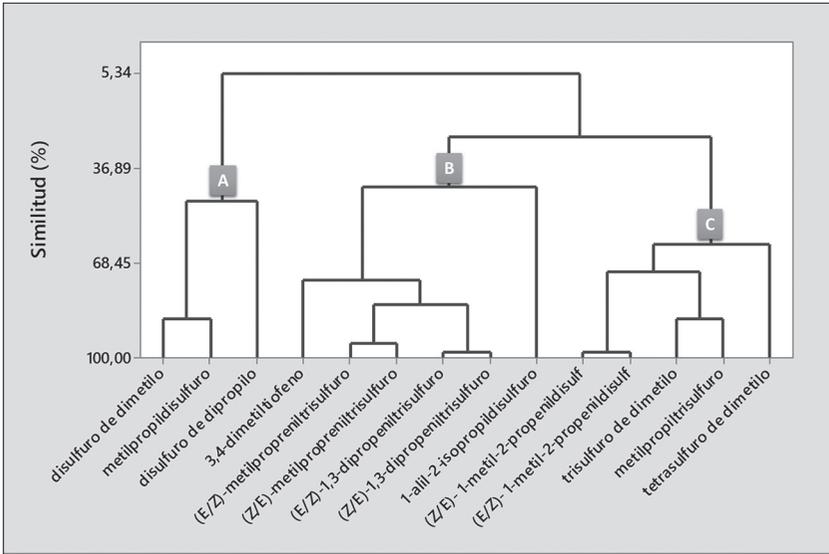


Figura 4. Dendrograma de todas las muestras analizadas.

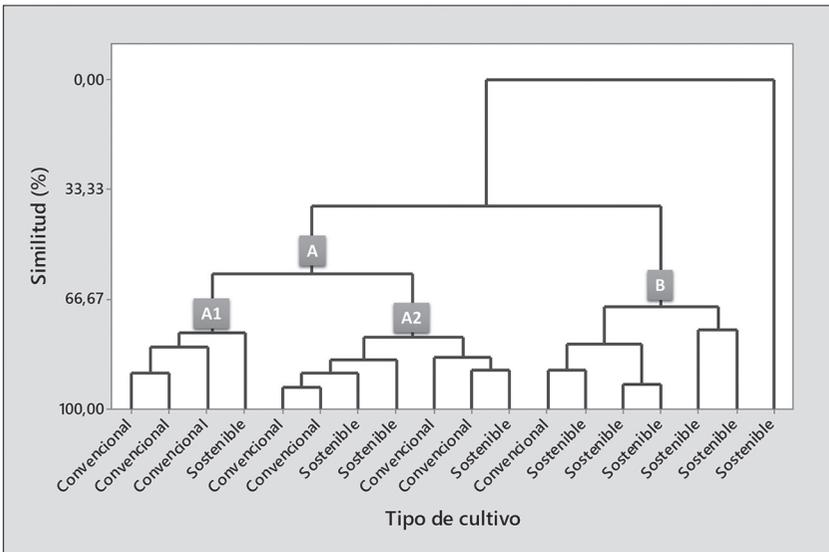


Figura 5. Dendrograma de las variedades de puerro (Duraton y Gigante).

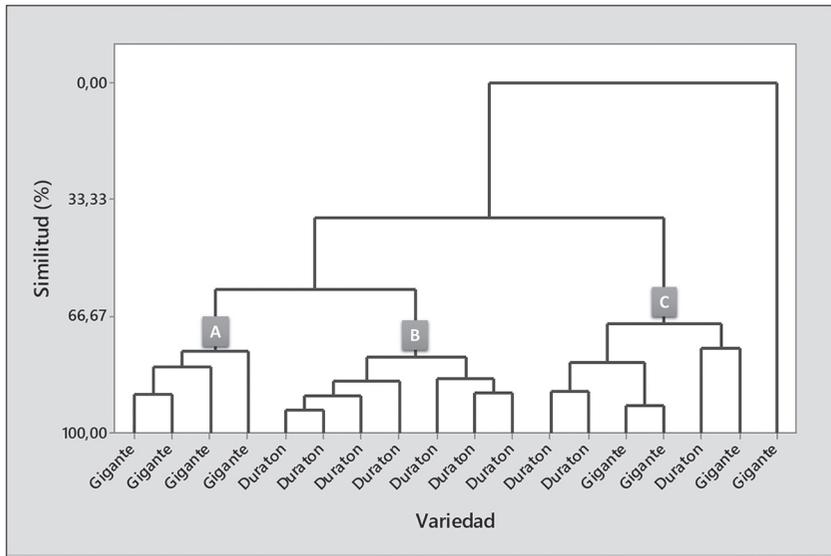


Figura 6.

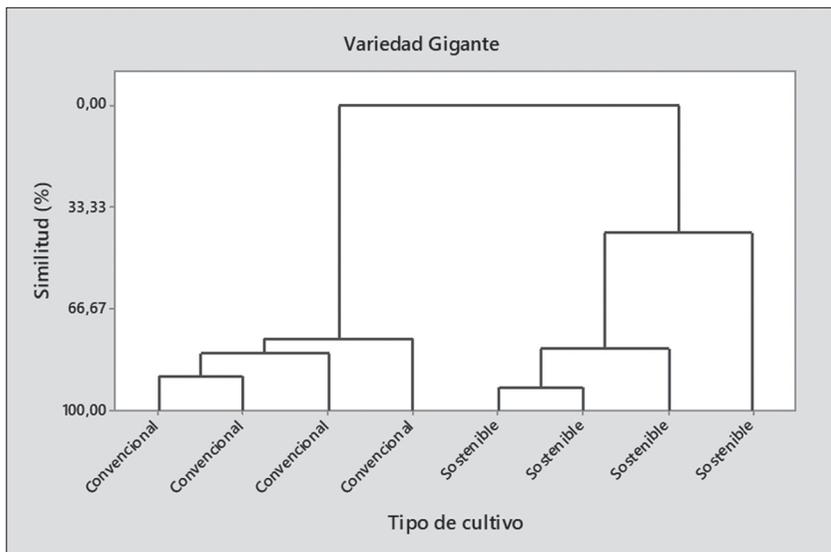


Figura 7. Dendrograma de la variedad Duraton en función del tipo de cultivo.

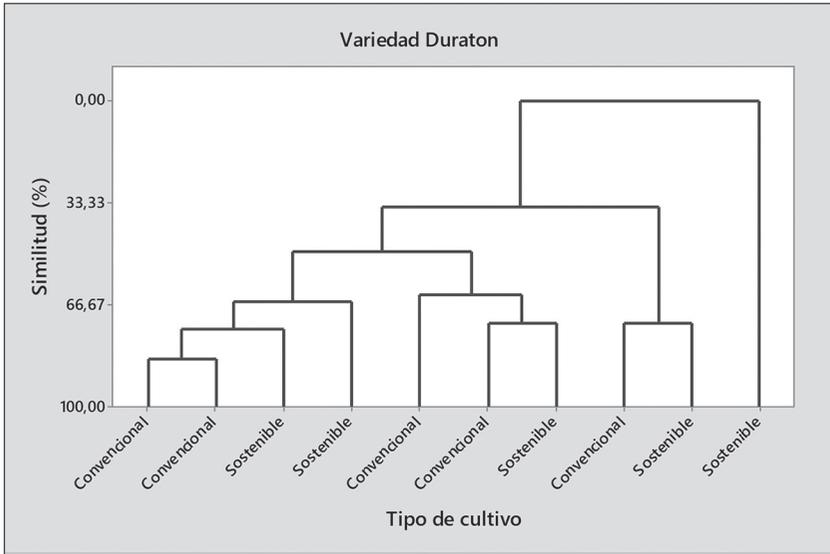


Figura 8. Dendrograma de compuestos de la variedad Gigante.

